



WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

PCT

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁴ : C12P 19/02, 19/12, 19/30 C12N 15/00, 1/20, 7/00	AI	(11) International Publication Number: WO 87/ 05937 (43) International Publication Date: 8 October 1987 (08.10.87)
---	----	--

<p>(21) International Application Number: PCT/US87/00605</p> <p>(22) International Filing Date: 24 March 1987 (24.03.87)</p> <p>(31) Priority Application Numbers: 843,349 029,091</p> <p>(32) Priority Dates: 24 March 1986 (24.03.86) 23 March 1987 (23.03.87)</p> <p>(33) Priority Country: US</p> <p>(60) Parent Applications or Grants US 843,349 (CIP) 24 March 1986 (24.03.86) 029,091 (CIP) 23 March 1987 (23.03.87) US Filed on US 029,091 (CIP) 23 March 1987 (23.03.87)</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): GETTY SCIENTIFIC DEVELOPMENT COMPANY [US] US]; 3901 Briarpark, Houston, TX 77215-0070 (US).</p> <p>Published With international search report.</p>		<p>(72) Inventors: and Inventors/Applicants (for US only): BETLACH, Michael, R. [US/US]; 4848 West Moorhead Circle, Boulder, CO 80303 (US); DOHERTY, Daniel, H. [US/US]; 719 Itasca Drive, Boulder, CO 80303 (US); VANDERSLICE, Rebecca, W. [US/US]; 1011 Tantra Park Circle, Boulder, CO 80303 (US).</p> <p>(74) Agent: GARRETT, Arthur, S.; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, 1775 K Street, N.W., Washington, DC 20006 (US).</p> <p>(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), DK, FI, FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), NO, SE (European patent), US, US.</p>	
--	--	--	--

(54) Title: PROCESS FOR THE SYNTHESIS OF SUGAR NUCLEOTIDES USING RECOMBINANT-DNA METH-ODS

(57) Abstract

A recombinant-DNA mediated method for the synthesis of sugar nucleotides. This method utilizes portable DNA sequences capable of directing the microbial synthesis of various enzymes that catalyze the synthesis of sugar nucleotides, including UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and GDP-mannose. The sugar moieties of these sugar nucleotides may subsequently be incorporated into industrially-useful polysaccharides such as xanthan gum. It has been found that vectors containing the portable DNA sequences described herein are capable both causing sugar nucleotide production in microorganisms previously incapable of such synthesis and of causing increased sugar nucleotide production in organisms capable of synthesizing small quantities of these compounds. In particular, plasmids pAS7, pAS9 and pT513 are disclosed. These plasmids are capable of directing sugar nucleotide synthesis in various hosts, including *Xanthomonas* sp. such as *X.campestris* and other organisms such as *E.coli* and various *Pseudomonas* sp.

ENZYMES:

1. GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE
2. MANNOSE PHOSPHATE ISOMERASE
3. PHOSPHOGLUCOMUTASE
4. UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE
5. UDP-GLUCOSE DEHYDROGENASE
6. UDP-GLUCURONATE EPIMERASE
7. GLUCOSAMINE PHOSPHATE ISOMERASE
8. GLUCOSAMINE PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE
9. ACETYLGLUCOSAMINE PHOSPHOMUTASE
10. UDP-GLUCOSAMINE PYROPHOSPHORYLASE
11. PHOSPHOMANNOSE MUTASE
12. GDP-MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE

PATHWAYS OF SUGAR NUCLEOTIDE SYNTHESIS IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*.
UDP-GLUCOSE, UDP-GLUCURONATE, AND GDP-MANNOSE ARE XANTHAN PRECURSORS;
UDP-GLUCOSE, UDP-GALACTURONATE, AND GDP-MANNOSE ARE LIPOPOLYSACCHARIDE PRECURSORS; AND UDP-N-ACETYL GLUCOSAMINE IS A CELL WALL PEPTIDOGLYCAN PRECURSOR.

1. FRUCTOSE-6-P → GLUCOSE-6-P
2. MANNOSE-6-P → FRUCTOSE-6-P
3. GLUCOSE-6-P → GLUCOSE-1-P
4. GLUCOSE-1-P → UDP-GLUCOSE
5. UDP-GLUCOSE → UDP-GLUCURONATE
6. UDP-GLUCURONATE → UDP-GALACTURONATE
7. FRUCTOSE-6-P → GLUCOSAMINE-6-P
8. GLUCOSAMINE-6-P → N-ACETYL-GLUCOSAMINE-6-P
9. N-ACETYL-GLUCOSAMINE-6-P → N-ACETYL-GLUCOSAMINE-1-P
10. N-ACETYL-GLUCOSAMINE-1-P → UDP-N-ACETYL-GLUCOSAMINE
11. UDP-N-ACETYL-GLUCOSAMINE → UDP-GLUCOSAMINE PYROPHOSPHORYLASE
12. GDP-MANNOSE → UDP-MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE



FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	GA	Gabon	MG	Madagascar
AU	Australia	GB	United Kingdom	MC	Monaco	LU	Luxembourg
BB	Barbados	HU	Hungary	LI	Liechtenstein	LK	Sri Lanka
BE	Belgium	IT	Italy	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
BG	Bulgaria	JP	Japan	SD	Sudan	SG	Singapore
BR	Brazil	KE	Kenya	SI	Slovenia	SN	Senegal
BU	Burkina Faso	KG	Kyrgyzstan	SV	Sweden	TD	Chad
CF	Central African Republic	LA	Laos	TG	Togo	US	United States of America
CG	Congo	LV	Latvia				
CH	Switzerland	LT	Lithuania				
CM	Cameroon	ML	Mali				
DE	Germany	MR	Mauritania				
DK	Denmark	MW	Malawi				
FI	Finland	NL	Netherlands				



PROCESS FOR THE SYNTHESIS OF SUGAR NUCLEOTIDES USING RECOMBINANT-DNA METHODS

BACKGROUND OF THE INVENTION

This is a continuation-in-part application of United States Patent Application Serial No. 843,349 filed March 24, 1986.

The present invention relates to recombinant-DNA methods for the production of various sugar nucleotides, which sugar moieties may be subsequently incorporated, also using recombinant-DNA methods, into microbially-produced polysaccharides.

It has long been known that certain microorganisms are capable of producing various industrially-useful polysaccharides. As a precedent to polysaccharide biosyntheses, these microorganisms must have a source of sugar nucleotides to construct the polysaccharides. In the case of *Xanthomonas campestris*, a microorganism capable of producing xanthan gum, it has been found that the sugar nucleotides UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid are all direct precursors in the biosynthetic pathway. Thus, in elucidating the pathway for xanthan biosynthesis, the present inventors have discovered the DNA sequences responsible for sugar nucleotide synthesis in *X. campestris* and have developed recombinant-DNA methods for the production of these sugar nucleotides in both *Xanthomonas* sp. and alternate hosts.

The development of these methods for increasing sugar nucleotide production in *Xanthomonas* sp. naturally capable of producing xanthan gum should enable increased production of this polysaccharide by these organisms. It has been found that, although there are detectable levels of the sugar nucleotide precursors in these organisms, these levels are low. It has also been noted that in *Xanthomonas* organisms, wherein there is a mutation in the portion of the biosynthetic pathway responsible for polysaccharide assembly, the intracellular quantities of these sugar nucleotide precursors increase two- to seven-fold. Thus, it is believed that a rate-limiting step in natural xanthan production might be the sugar nucleotide precursor concentration and that the intracellular sugar nucleotide concentration can be increased by introduction of additional DNA sequences capable of directing sugar nucleotide production.

SUBSTITUTE SHEET



It has also been found that certain microorganisms which may be deemed desirable as alternate hosts for use in recombinant-DNA methods for the production of xanthan gum, generally either do not produce the required sugar nucleotide precursors or do not produce them in sufficient quantities to allow for xanthan production. Such recombinant-DNA methods and examples of the alternate hosts currently contemplated are set forth in United States Patent Application Serial No. 844,332 of Michael A. Capage et al. entitled "Recombinant DNA-Mediated Production of Xanthan Gum," filed on March 26, 1986. In these methods, it is therefore necessary to induce the alternate host to produce the required sugar nucleotide precursors in addition to expressing the xanthan biosynthetic genes. The instant invention in part provides such a method.

Moreover, the present method may be used to induce sugar nucleotide production where the sugars are intended to be incorporated into polysaccharides other than xanthan. For example, various other gums have been identified which are altered versions of xanthan which require some or all of the instant sugar nucleotides as biosynthetic precursors. These gums include the polytrimer gum described in co-pending United States Patent Application Serial No. 762,878 of Vanderslice et al. entitled "A Polysaccharide Polymer Made by Xanthomonas" filed August 6, 1985.

In addition, it is contemplated that the recombinant-DNA methods for producing sugar nucleotides disclosed herein may be used for the production of certain polysaccharides of interest in part as medicinal or pharmaceutical preparations. For example, the polysaccharide colonic acid, produced by *E. coli*, is contemplated as a potential synthetic antigen useful for vaccination purposes. It is believed that production of colonic acid would be initiated or enhanced by the increased microbial production of the precursor sugar nucleotides.

Introduction of the DNA sequences into other microbial species may also enhance production of sugar nucleotides directed by such sequences since normal regulatory mechanisms controlling expression and activity may not be effective with



foreign DNA or enzymes. In addition, many antibiotics, for instance the general class of macrolide antibiotics produced by *Streptomyces* species, have sugar moieties derived from sugar nucleotide precursors. The recombinant DNA methods for producing sugar nucleotides could be applied to such organisms increasing the availability of precursors essential for biosynthesis of the antibiotics.

SUMMARY OF INVENTION

One object of the present invention is to provide a method for the recombinant-DNA mediated production of sugar nucleotides. It is contemplated that these sugar nucleotides may be used in the *in vivo* synthesis of various polysaccharides, particularly in the synthesis of xanthan and novel polysaccharides structurally related to xanthan described more fully in the United States Patent Application Serial No. 844,435 of Doherty *et al.*, entitled "Family of Xanthan-Based Polysaccharide Polymers Including Non-Acetylated and/or Non-Pyruvylated Gum and Acetylated or Non-Acetylated Polytetramer Gum" filed March 26, 1986.

To facilitate the recombinant-DNA mediated synthesis of these sugar nucleotides, it is a further object of the present invention to provide vectors containing these portable sequences. These vectors are capable of being used in the recombinant systems to produce quantities of the sugar nucleotides sufficient to create microbially-produced polysaccharides. Additional objects and advantages of the invention will be set forth in part in the description or may be learned from practice of the invention. The objects and advantages may be realized and attained by means of the instrumentalities and combinations particularly pointed out in the appended claims.

To achieve the objects and in accordance with the purposes of the present invention, methods for the production of sugar nucleotides are set forth. The sugar moieties of such sugar nucleotides may be incorporated, using the methods and vectors set forth in United States Patent Application Serial No. 844,332 of Capage *et al.*, entitled "Recombinant-DNA Mediated Production of Xanthan Gum," filed March 26, 1986, into polysaccharides such as xanthan.



The portable DNA sequences may be either synthetic sequences or restriction fragments ("natural" DNA sequences). In a preferred embodiment, portable DNA sequences are isolated from an *X. campestris* library and are capable, when transferred into an alternative host, of directing the production of at least one sugar nucleotide.

Additionally, to achieve the objects and in accordance with the purposes of the present invention, a recombinant-DNA mediated method is disclosed which results in microbial manufacture of sugar nucleotides which can be used to produce xanthan gum and other polysaccharides using the portable DNA sequences referred to above. This recombinant DNA method comprises:

- preparation of at least one portable DNA sequence capable of directing an alternate host microorganism to produce at least one sugar nucleotide;

- cloning the portable DNA sequence into a vector capable of being transferred into and replicating in a host microorganism, such vector containing elements for expression of the portable DNA sequence encoding the biosynthetic enzymes;
- transferring the vector containing the portable DNA sequence into a host microorganism capable of producing the biosynthetic enzymes for sugar nucleotide synthesis under the direction of the portable DNA sequence;

- culturing the host microorganism under conditions appropriate for maintenance of the vector and synthesis of the sugar nucleotides; and optionally

- harvesting the sugar nucleotides.

To further accomplish the objects and in further

accordance with the purposes of the present invention, a series of plasmids are provided, each of which contains at least one of the portable DNA sequences discussed above. In particular,

plasmids PAS7, PAS9, and PTS13 are disclosed. In addition, a mutant strain of *X. campestris*, strain X872, is provided which is deficient in phosphoglucomutase. *Xanthomonas campestris*

strain X872 has been deposited on March 21, 1986 in the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, under Accession No. 53471. *E. coli* LE392(PAS9); bearing plasmid PAS9, *E. coli* LE392(PAS7), bearing plasmid PAS7; and *E. coli*

SUBSTITUTE SHEET



LE392(PTS13), bearing plasmid PTS13, have been deposited on March 21, 1986 in the ATCC under Accession Nos. 67050, 67048 and 67047, respectively.

It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention, as claimed. The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of this specification, illustrate various embodiments of the invention and, together with the description, serve to explain the principles of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a depiction of the biosynthetic pathways for the synthesis of UDP-glucose, UDP-glucuronate and GDP-mannose.

Figure 2 depicts the separation of UDP-glucose, GDP-mannose, UDP-galacturonic acid, and UDP-glucuronic acid in a standard mixture by high performance liquid chromatography. UDP-N-acetylglucosamine served as an internal standard. Ultraviolet spectra from 240 to 300 nm are shown for each compound. Figure 3 depicts a chromatogram of a cell extract from strain X872, representative of mutants which are missing UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and UDP-galacturonic acid (class 1). Spectra of peaks eluting in the regions of interest are shown for comparison with those in Figure 2.

Figure 4 depicts a chromatogram of a cell extract from strain X869, representative of mutants which are missing GDP-mannose (class 2). Spectra of peaks eluting in the regions of interest are shown for comparison with those in Figure 2. Figure 5 depicts a chromatogram of a cell extract from strain X871, representative of mutants which are missing UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid (class 3). Spectra of peaks eluting in the regions of interest are shown for comparison with those in Figure 2.

Figure 6 depicts a chromatogram of cell extract X866, representative of mutants which are missing UDP-glucose, GDP-mannose, UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid (class 4). Spectra of peaks eluting in the regions of interest are shown for comparison with those in Figure 2.

SUBSTITUTE SHEET

The sugar nucleotides UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid are direct precursors in the biosynthetic pathway for xanthan gum. Addition of all of these compounds is required to detect in vitro xanthan biosynthesis as described by Vanderslice et al., supra, specifically incorporated herein by reference. Because of the specificity of sugar transferases, other sugar nucleotides such as ADP-glucose cannot serve as precursors to xanthan. The pathways for synthesis of the three required sugar nucleotides in X. campestris are presented in Figure 1. Xanthomonas campestris does not have detectable

xanthan gum and variants thereof. The sugar nucleotides UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid useful in part in the production of xanthan gum, a description of the production of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid useful in part in the production of xanthan gum, is, using recombinant-DNA methods, of various sugar nucleotides. The following detailed description uses, by way of example, a description of the production of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid useful in part in the production of xanthan gum and variants thereof.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention relates generally to the synthesis, using recombinant-DNA methods, of various sugar nucleotides. The following detailed description uses, by way of example, a description of the production of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid useful in part in the production of xanthan gum and variants thereof.

Figure 10 depicts a chromatogram of a cell extract from Paracoccus denitrificans, showing the presence of UDP-glucose and GDP-mannose, but not UDP-glucuronic acid. Figure 11 depicts spectra verifying the identification of UDP-glucose and other uridine-containing compounds in the cell extract of Paracoccus denitrificans shown in Figure 10. Figure 12 depicts spectra verifying the identification of GDP-mannose in the cell extract of Paracoccus denitrificans shown in Figure 10, and indicating that late-eluting compounds observed in the figure are adenosine-containing compounds.

Figure 7 shows the steps in the construction of plasmid pTS13, which complements the defect preventing synthesis of UDP-glucose and UDP-glucuronic acid in mutant X649 (class 1). Figure 8 shows the steps in the construction of plasmid pAS9, which complements the defect preventing synthesis of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid in mutant X652 (class 4), and defects preventing the synthesis of GDP-mannose in mutants X711 and X712 (class 2). Figure 9 shows the steps in the construction of plasmid pAS7, which complements defects preventing the synthesis of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid in mutant X652 (class 4), and defects preventing the synthesis of GDP-mannose in mutants X711 and X712 (class 2).

concentrations of UDP-galactose, so that the glucose-1-phosphate-UDP-galactose uridylyl transferase reaction observed in other bacteria such as *E. coli* cannot occur.

Mutant strains of *X. campestris*, unable to make xanthan gum in vivo (gum- strains), can be divided into two classes, based on the ability of cell lysates to synthesize xanthan in vitro when supplied with UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid. Mutants unable to make xanthan in vitro are defective in the xanthan biosynthetic machinery (sugar transferases and polymerase). Those able to make xanthan in vitro when supplied with exogenous substrates are deficient in the ability to make the required precursors in vivo. Some of this second class of mutants include those defective in glucose transport and metabolism itself, where the rate of xanthan synthesis is very low. Others, described below, have the normal complement of catabolic enzymes, but are lacking enzymes required to synthesize one or more of the sugar nucleotides themselves.

Such mutants have been obtained by picking gum- colonies after transposon mutagenesis of *X. campestris* and analyzing in vitro xanthan biosynthesis in the presence of added UDP-glucose, GDP-mannose, and UDP-glucuronic acid. The specific sugar nucleotide defects have been identified in vivo by extraction of the sugar nucleotides and analysis of extracts using high performance liquid chromatography procedures. Four mutant classes have been identified. These include those defective in synthesis of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and other sugar nucleotides derived from these compounds; 2) those defective in synthesis of GDP-mannose and related compounds; 3) those defective in synthesis of UDP-glucuronic acid, GDP-mannose, and related compounds; and 4) those defective in synthesis of UDP-glucose. Mutant class 3 is clearly defective in UDP-glucose dehydrogenase, since conversion of UDP-glucose to UDP-glucuronic acid is a single step process. The other mutant classes have been characterized by analysis of in vitro enzyme activities required for sugar nucleotide biosynthesis.



Glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate are key intermediates in microbial metabolism. The pathway from fructose-6-phosphate to UDP-N-acetyl glucosamine is common to gram negative and gram positive bacteria. UDP-N-acetyl glucosamine is an essential precursor of peptidoglycan in the cell wall. The two pyrophosphorylases depicted as 4 and 12 in Fig. 1, are the committed steps in biosynthesis of UDP-glucose and GDP-mannose; in other organisms glucose-1-phosphate can react with other nucleotide triphosphates to form other sugar nucleotides, e.g., ADP-glucose and TDP-glucose. In the UDP-glucose pathway, the gene for UDP-glucose pyrophosphorylase, as described in Example 4 has been isolated. Mutations in this gene prevent synthesis not only of UDP-glucose but also of the other sugar nucleotides derived from it, viz. UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid. The gene for UDP-glucose dehydrogenase (enzyme 5) has also been isolated as set forth in Example 5. Mutations in this gene prevent synthesis of UDP-glucuronic acid and sugar nucleotides derived from it, viz. UDP-galacturonic acid. Such polar effects consequently disrupt not only xanthan biosynthesis but also lipopolysaccharide synthesis in *X. campestris* by disrupting the supply of sugar nucleotides for that process.

In addition, mutants deficient in the synthesis of GDP-mannose have been found. These mutants grow normally on mannose, and so possess enzyme 2, phosphomannose isomerase, an enzyme commonly found in bacteria. Consequently, they must be deficient in enzymes 11 and/or 12 as described in Example 9.

Cross-hybridization mapping and restriction maps indicate these mutations occur in at least two separable sites within the *X. campestris* chromosome. A plasmid has been developed which promotes synthesis of GDP-mannose when inserted into these mutants. The details of this plasmid are set forth in Example 6. In addition, this plasmid complements the gum- defect of a mutant unable to make phosphoglucomutase (pgm) as well as GDP-mannose. This mutation may be in a regulatory gene controlling expression of pgm or it may be in the pgm structural gene itself.

Another mutant, X872, defective only in phosphoglucomutase, has been found. By the procedures described herein, one



of ordinary skill in the art, in light of the current state of the applicable science, can construct a plasmid carrying a wild-type copy of this gene.

Thus, the genes for the synthesis of the immediate xanthan precursors have been identified by the present inventors. These genes include the genes for enzymes required for synthesis of UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid. Plasmids containing wild-type copies of the genes encoding the enzymes have been obtained from a genomic library constructed in the phage lambda. ³²P-labeled plasmid DNA of recombinant plasmids consisting of the vector RSF1010 carrying a cloned DNA segment of chromosomal DNA from a transposon-induced sugar nucleotide defective mutant has been identified. The cloned fragment contains the transposon and flanking chromosomal DNA. Such recombinants are readily isolated as described by Capage et al., supra. Three multicopy broad host range plasmids have been constructed using standard techniques as described more fully in the Examples below. These plasmids, PTS13, PAS7 and PAS9, contain DNA which complements strains from mutant classes 1, 2, and 3, respectively, as described above. In addition, plasmid PAS7 complements a mutant from class 4. None of these plasmids cross-hybridize with DNA within or flanking the region containing the xanthan biosynthetic genes themselves. Two different mutant loci have been identified in plasmid PAS7 by cross-

hybridization of lambda phage, restriction fragment analysis and genetic complementation. Construction of the plasmids and additional information is provided in Figures 7 through 9, discussed in more detail in the Examples below.

Each plasmid, when inserted into mutants in the appropriate complementation group, restores the ability of the mutants to produce xanthan gum, as denoted by the mucoid appearance of the resultant colonies. In addition, sugar nucleotides have been examined in extracts from the complemented strains to insure that the plasmids have restored the missing biosynthetic ability. Plasmid PTS13 most apparently carries the gene for UDP-glucose pyrophosphorylase, since mutant X649 is unable to make UDP-glucose but has wild-type amounts of phosphoglucomutase. Furthermore, plasmid PTS13 when inserted into mutants



derived from X649 confers the ability to make UDP-glucose pyrophosphorylase (Example 8). The strain grows normally on glucose so it is not defective in synthesis of glucose-6-phosphate, a key intermediate in utilization of glucose for growth.

As noted above, there is an absolute requirement for UDP-glucose, GDP-mannose and UDP-glucuronic acid in order for bacteria to synthesize xanthan gum. Although modification of xanthan by acetylation and pyruvylation, requiring acetyl-coenzyme A and phosphoenolpyruvate, respectively, as precursors, affects rheological properties of the gum, acetylation or pyruvylation is not required for its biosynthesis. In addition, both of these latter precursors are essential components of bacterial metabolism. UDP-glucose, GDP-mannose, and UDP-glucuronic acid are common sugar nucleotides in certain bacteria, but not all bacteria have them all or have them in quantities sufficient to support xanthan synthesis. Expression of the xanthan biosynthetic pathway in organisms other than *X. campestris* requires that the sugar nucleotide precursors are synthesized in such alternative hosts, preferably at rates sufficient to support economic production of xanthan gum. Several alternative hosts have been identified which have little or no UDP-glucuronic acid (See Example 7). Insertion of DNA carrying the gene for UDP-glucose dehydrogenase into such a strain would be essential to obtain xanthan synthesis at a high rate.

The basic requirements for expression of sugar nucleotide biosynthetic genes in alternative hosts are similar to those in *X. campestris* mutants. The gene or genes required must be inserted into the host in a fashion so that they can be stably maintained, whether by integration into the chromosome or maintenance on a plasmid. The gene construct must be such that the host will synthesize the appropriate mRNA and translate it into a functional protein, which preferably will be relatively stable in the new host. In addition, the host must be able to provide the substrates and cofactors required for synthesis of the sugar nucleotide itself.

Both high and low copy number plasmids exist which have broad host ranges. Insertion of the appropriate sugar nucleotide biosynthetic genes onto plasmids has already

SUBSTITUTE SHEET

occurred. Transformation or conjugation can be used to introduce such plasmids into alternative hosts in a fashion similar to that by which the plasmids were transferred from *E. coli* to mutant *X. campestris* strains. These broad host range plasmids generally will infect Gram negative bacteria. Shuttle vectors exist by which the *X. campestris* genes can be transferred to Gram positive bacteria, if desired. Insertion of the plasmids and maintenance can be verified by standard procedures.

Expression of the genes in alternative hosts can be monitored in several ways: the mRNA transcribed from the gene can be detected by hybridization; the protein itself can be detected by immunoassay or functional assay; and the sugar nucleotide previously missing can be identified by established chromatographic procedures. Analysis by one or several of these techniques, as required, should permit adjustments in the gene construct to optimize expression.

The intracellular environment of alternative hosts will likely be similar to that of *X. campestris*, particularly if similar external environments are maintained--e.g. pH and temperature. It is known from *in vivo* studies with *X. campestris* that xanthan biosynthesis takes place over a broad temperature range, i.e., 12° to 37°C, though the rate is maximal between 27° and 30°C. Clearly, the enzymes responsible for synthesis of the sugar nucleotide precursors must be functional within this range. Initial analyses would be conducted at 27° to 30°C. It is to be understood that broad application of the teachings of the present invention to the production of specific sugar nucleotides in various hosts will be within the capabilities of one having ordinary skill in the art in light of the teachings contained herein. Thus, the following Examples are illustrative only and are not restrictive of the invention, as claimed.

Example 1

This example discusses the specific sugar nucleotide defects identified in various *X. campestris* strains that are gum- *in vivo*. The initial collection of mutants defective in sugar nucleotide synthesis was obtained from *X. campestris* strains



SUBSTITUTE SHEET

The following method was employed to identify the specific sugar nucleotide defects in strains which were gum+ in vitro but gum- in vivo. An isolated colony from each strain was picked and inoculated into 10 ml YM broth (3 g yeast extract, 3 g malt extract and 5 g peptone per liter) with 2% glucose in a 125 ml Erlenmeyer flask. Cultures were incubated at 30°C, 250 rpm, for 24 hours or until turbid. Five percent inocula were transferred from YM broth into modified PACE medium (5 g KH_2PO_4 , 5 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.53 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.006 g H_3BO_3 , 0.006 g ZnCl_2 , 0.003 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.02 g CaCl_2 per liter, pH 7.0) with glucose as the carbon source and allowed to grow at 30°C for 24 hours. Cultures were harvested by centrifugation, washed twice with PACE salts, and resuspended in a volume of PACE sufficient to give an absorbance at 600 nm of 100. Samples, 1.5 ml, were placed in 50 ml Erlenmeyer flasks containing sufficient glucose to bring the concentration to 20 mM. Each sample was incubated in a 30°C water bath at 400 rpm for ten minutes, then 1 ml was removed and added to 0.1 ml of 11 N formic acid in an Eppendorf centrifuge tube. The tube was capped, the contents mixed for 5 seconds on a vortex mixer, then the tube was placed in a dry ice-alcohol bath. After all samples had been processed, the tubes were removed from the dry ice bath, thawed at room temperature, and centrifuged for 5 minutes to pellet the cell debris. The supernatants were placed in prechilled 15 ml conical centrifuge tubes and frozen in a dry ice-alcohol bath again. Frozen samples were placed on a

unable to make xanthan in vivo after transposon mutagenesis, as described in Capage et al., supra. Several gum- strains were able to make xanthan in vitro when supplied with the sugar nucleotides UDP-glucose, GDP-mannose, and UDP-glucuronic acid. These mutants were defective in sugar nucleotide synthesis, rather than biosynthesis of xanthan itself. Subsequently, such mutants were found to be sensitive to the dye toluidine blue. Additional sugar nucleotide mutants were obtained by screening other gum- strains for toluidine blue sensitivity. These strains proved to be resistant to some virulent phage which killed wild-type X. campestris and gum- mutants defective in xanthan biosynthesis itself.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

lyophilizer and taken to dryness. The contents of each tube were dissolved in 0.2 ml HPLC buffer, composed of 40 mM phosphoric acid adjusted to pH 6.5 with triethylamine (Aldrich). Samples were filtered through 0.45 μ m filters into microsample vials, then analyzed by injection onto a 4.6 mm x 250 mm C18 reverse phase ion pair column, 40°C, flow rate of 0.8 ml per minute. Sugar nucleotides were identified by comparing retention times to those of standards run under the same conditions (Figure 2), and by examining the spectra of compounds eluting in the region of interest.

Four classes of sugar nucleotide mutants were identified using this procedure:

- (1) mutants unable to synthesize UDP-glucose and UDP-glucuronic acid;
- (2) mutants unable to synthesize GDP-mannose;
- (3) mutants able to synthesize UDP-glucose but not UDP-glucuronic acid; and
- (4) mutants unable to synthesize UDP-glucose, GDP-mannose, and UDP-glucuronic acid.

Representative chromatograms and spectra of standards for each mutant class are shown in Figures 2 through 6. Mutants in classes 1, 3, and 4 also did not synthesize UDP-galacturonic acid, a X. campestris lipopolysaccharide precursor. Based on these data, X. campestris must make UDP-galacturonic acid from UDP-glucuronic acid.

Extracts from wild-type strains of X. campestris had all of the sugar nucleotides required for xanthan biosynthesis. Gum- mutants defective in the xanthan biosynthetic pathway itself had higher concentrations of the precursor sugar nucleotides than did wild-type cells as set forth in Table 1.



Table 1. Relative amounts of UDP-glucose, GDP-mannose, and UDP-glucuronic acid in wild-type *X. campestris* and mutants deficient in the xanthan biosynthetic enzymes themselves.

UDP-glucuronic acid	GDP-mannose	UDP-glucose	
<u>X. campestris</u>	<u>S4-L</u>	<u>X. campestris</u>	<u>X648</u>
1.0	4.7	2.5	3.5
2.0	5.4	3.5	1.9
<u>X. campestris</u>	<u>X655</u>	<u>X. campestris</u>	<u>X705</u>
1.0	7.1	4.2	2.0

These data indicate that the rate of xanthan synthesis in wild-type cultures may be limited by the supply of precursor sugar nucleotides.

Example 2

This example describes phosphoglucomutase activity in *X. campestris* transposon-induced mutants defective in sugar nucleotide synthesis.

Cytoplasmic and membrane fractions were prepared from the transposon mutants previously found to be defective in sugar nucleotide synthesis. Extracts of *X. campestris* S4-L, NRRL, B1459, were also prepared to serve as positive controls. Cultures were transferred from isolated colonies on plates to 5 ml YM broth with 1% glucose and grown on a tube roller into stationary phase. Duplicate 500 ml flasks containing 100 ml YT (8 g tryptone, 5 g yeast extract and 5 g NaCl per liter) broth with 1% glucose were inoculated with 2 ml of culture and placed on a shaker at 300 rpm in a 30°C incubator. After 24 hours the cultures were combined and centrifuged. The cell pellets were washed twice in 100 ml phosphate-buffered saline, pH 7.2, then resuspended to 20% wet weight to volume in 50 mM MOPS buffer, pH 7.2, containing 10 mM MgCl₂. This procedure was used to remove residual culture medium from the cells. The cell suspensions were disrupted by passage twice through a French pressure cell

operated at 15,000 psi. Lysates were treated with DNase to reduce viscosity, then centrifuged at 2,500 x g to remove unbroken cells and debris. The supernatants were carefully removed with a Pasteur pipette, then separated into cytoplasmic and membrane fractions by centrifugation in a swinging bucket rotor at an average centrifugal force of 130,000 x g. The supernatants containing the cytoplasmic contents were decanted and frozen at -70°C. Each membrane-containing pellet was resuspended in 1.0 ml of MOPS $MgCl_2$ buffer, then also frozen at -70°C. Enzymes required for sugar nucleotide synthesis are normally found in the cytoplasmic contents. Separation of the cytoplasmic contents from the cell membranes facilitates enzymatic assays coupled to reduction of NADP. NADPH oxidase is a membrane-bound enzyme, and unless removed or inactivated can rapidly reoxidize the reduced pyridine nucleotides whose accumulation is used to follow the reactions.

The protein concentration in each cytoplasmic extract was determined using the procedure of Lowry et al., *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951), specifically incorporated herein by reference, with bovine serum albumen as the standard. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in each extract was measured by following the increase in absorbance at 340 nm due to the accumulation of NADPH produced during the oxidation of glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconate. This enzyme is a key enzyme in the metabolism of glucose by *X. campestris*, and served as an internal control. Reaction conditions are described in a footnote to Table 2.

Phosphoglucomutase, which converts glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate, the direct precursor of UDP-glucose, was also assayed in the cytoplasmic fractions. The mutase activity is reversible, so glucose-1-phosphate was used as the substrate. In addition, purified glucose-6-phosphate dehydrogenase purchased from Sigma Chemical Co. was added to the reaction mixture in excess. The rate of formation of NADPH is a measure of the rate at which glucose-6-phosphate was formed by phosphoglucomutase present in the extracts. Reaction conditions and results of the assay are summarized in Table 2.



Table 2. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and phosphoglucomutase (PGM) activity in cytoplasmic extracts of *Transposon*-induced sugar nucleotide mutants of *X. campestris*. Enzyme activities are expressed as nmol/min/mg protein.

Strain	UDPGlc	GDPman	UDPGlcA	G6PD ^a	PGM ^b
S4-L	+	+	+	268	238
X649	-	+	+	182	411
X652	-	-	-	255	2
X711	+	-	+	144	191
X712	+	-	+	154	223
X736	+	+	-	184	496
X826	+	+	-	154	276
X871	+	+	-	97	348
X828	-	-	-	148	7
X866	-	-	-	151	1
X869	+	-	+	163	535
X872 ^c	-	+	-	104	2

a The reaction was started by adding 0.05 ml cytoplasmic

fraction, approximately 10 mg/ml protein. The reaction mixture contained 40 mM Tris HCl, pH 8.6, 5 mM glucose-6-phosphate, 1.6 mM NADP, and 15 mM MgCl₂ in 1.0 ml total volume.

b Reaction conditions as for G6PD, but glucose-1-phosphate was used instead of glucose-6-phosphate. The reaction mixture also contained 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM glucose-1,6-diphosphate, and approximately 10 units G6PD from Sigma Chemical Company.

c Deposited at ATCC Accession No. 53471
All extracts had significant activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, ranging from 97 to 268 nmol/min/mg protein. Phosphoglucomutase activity was 191 nmol/min/mg protein or higher in all extracts prepared from mutants capable of synthesizing UDP-glucose. Extracts from all mutants except X649



that were unable to synthesize UDP-glucose (X828, X652, X866, and X872) had little or no phosphoglucomutase activity. Such a defect is sufficient to prevent synthesis of UDP-glucose.

Strain X649 is unable to make the UDP-glucose family of sugar nucleotides. Phenotypically, it resembles the Tn903 mutant, strain X872. However, X649 has normal phosphoglucomutase activity, whereas strain X872 is defective in this enzyme. Strain X649 must be defective in the UDP-glucose pyrophosphorylase itself.

Strain X652 is unable to make the UDP-glucose and GDP-mannose families of sugar nucleotides. Like the Tn903 mutants X828 and X866 which lack these sugar nucleotides, X652 has little or no phosphoglucomutase activity. Mutants defective in GDP-mannose synthesis alone-- strains X657, X711, X712 and X869--have normal phosphoglucomutase activity. Strains X736, X826 and X871 are unable to make UDP-glucuronic acid. They also have normal phosphoglucomutase activity.

Example 3

This example describes the method for mapping sugar nucleotide defects in Tn10-induced mutants.

Plasmid probes were obtained for all Tn10-induced mutants defective in sugar nucleotide metabolism by cloning Tn10 plus flanking chromosomal sequences from each mutant. A lambda bank was probed to obtain lambda recombinants which hybridized to each probe but carried segments of *X. campestris* wild-type DNA. These phage were plaque-purified and used to map the sugar nucleotide mutations by cross hybridization to the plasmid probes containing Tn10 and flanking DNA.

None of the sugar nucleotide probes mapped within the DNA region containing genes for the xanthan biosynthetic pathway itself. Phage containing wild-type DNA for mutant X649 did not hybridize to any other sugar nucleotide probes. Similarly, phage containing wild type DNA did not hybridize to other sugar nucleotide probes. The defective genes in these strains thus are not linked to the other sugar nucleotide genes.

Plasmids pTX652, pTX657, pTX711 and pTX712 hybridized to an overlapping set of recombinant lambda phages containing

cloned *X. campestris* DNA. Plasmid pTX711 hybridized to some, but not all, of the lambda phage which hybridized to pTX652, pTX657 and pTX712.

Association of the mutation in strain X652 with mutations preventing synthesis of GDP-mannose was unexpected since X652 also cannot make UDP-glucose or UDP-glucuronic acid. The mutation in X652 may be in a transacting regulatory gene affecting synthesis of UDP-glucose and GDP-mannose, or in a structural gene encoding an enzyme essential for UDP-glucose synthesis, but exerting a polar effect on expression of the GDP-mannose genes.

Example 4

This example demonstrates complementation of the mutation in strain X649 by plasmid pTS13.

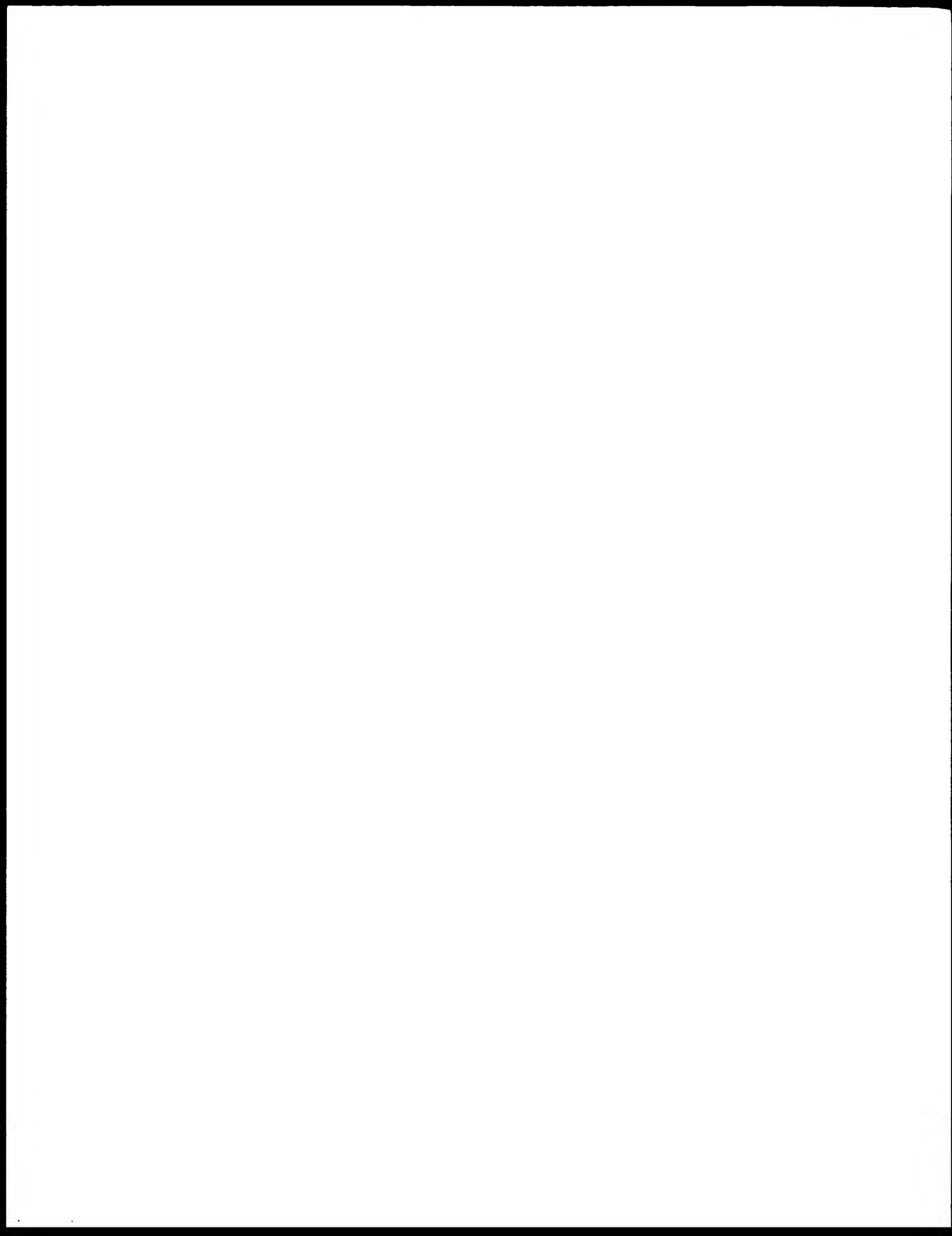
All sugar nucleotide mutants were obtained by

transposon mutagenesis. A lambda library of *X. campestris* genomic DNA was probed with plasmid pTX649 derived from cloning the transposon Tn10 plus flanking chromosomal sequences from the mutant X649 (as described in Capage et al., supra.), which is defective in synthesis of UDP-glucose and UDP-glucuronic acid. Ten lambda recombinants were identified that hybridized to the pTX649 probe. These phage were plaque-purified.

Restriction digests and gel electrophoresis was performed on the DNA of each lambda clone. In these digestion patterns, the wild type fragment of *X. campestris* DNA that is mutated in strain X649 was identified. This 6.5 kb *Pst*I fragment has been purified by electrophoresis from preparative agarose gels. This *Pst*I fragment was cloned into the *Pst*I site of pBR322 to make plasmid pTf6.5. Another plasmid was constructed by digesting pTf6.5 and plasmid RSF1010 with *Eco*RI, then ligating both plasmids together. Hybrid plasmids were selected by ability to confer streptomycin and tetracycline resistance to *E. coli* after transformation. This chimeric plasmid, pTS13, contains the 6.5 kb *Pst*I fragment (Figure 7).

The plasmid was then transferred to *X. campestris* strain X649 by a triparental conjugal transfer directed by pRK2013.

The cloned 6.5 kb fragment carried by pTS13 does complement mutant X649. When the mating mixture of the pTS13



transfer into X649 was plated on rif and strep, all of the colonies were G⁺ and not distinguishable from wild type. Three G⁺ exconjugants were analyzed and showed that they did contain the plasmid. Furthermore, a plasmid "curing" experiment was performed. In this experiment, X649 (pTS13) was grown up under conditions which promote loss of plasmids and then plated out in the absence of any drugs that would select the plasmid. In several experiments, significant frequencies (10-50%) of G⁺ colonies were observed in such platings. Three such G⁺ isolates were examined and showed that the plasmid pTS13 had been lost. However, three G⁺ isolates from such an experiment were all found to retain pTS13. The correlation between presence of the plasmid and the G⁺ phenotype argues that the initial G⁺ property is not due to recombination but rather to expression of the plasmid-borne gene.

Extracts were made from strains X649 and X649 containing pTS13. The extract from X649 with the plasmid had UDP-glucose, as determined by spectral analysis and retention time. The extract from X649 alone did not. Since extracts from X649 have normal amounts of phosphoglucomutase (Example 1), the enzyme defect which prevents synthesis of UDP-glucose must be located in the gene coding for UDP-glucose pyrophosphorylase, which is contained on plasmid pTS13. Because this plasmid is a chimera of RSF1010, it can be transferred to Gram negative bacteria other than *X. campestris*, and confer on them the ability to make UDP-glucose if they have the ability to make glucose-1-phosphate.

Example 5

This example demonstrates complementation of the mutation in strain X736 by plasmid pAS9.

A set of 5 recombinant lambda phages were isolated

that contained chromosomal *X. campestris* DNA from the region of

the Tn10 insertion in X736. These phages were isolated from the

lambda gene bank by screening for recombinant phages that hybridized to plasmid PTX736. Plasmid PTX736 consists of the *pstI*

fragment of chromosomal DNA from mutant X736 that contains the

Tn10 insertion causing the mutant phenotype, cloned into plasmid

vector RSF1010.



These Lambda 736(+) phages were screened by Southern blot hybridization to identify relatively large DNA segments that contained the wild-type *Pst*I fragment of interest. The DNA's from the Lambda recombinants were digested with several restriction endonucleases and run out on agarose gels along with a control of wild-type chromosomal DNA cut with the same set of enzymes. The digests were then probed with radiolabeled PTX736 plasmid DNA. *Sal*I digests of several different Lambda 736(+) isolates generated a fragment of 9 kb that hybridized to the probe. The *Sal*I digest of wild-type chromosomal DNA also produced a band of 9 kb that annealed to the probe. Because the Lambda 736 recombinants produced relatively few *Sal*I fragments, a shotgun cloning from Lambda into pMW79 was performed. The plasmid vector pMW79 contains a unique *Sal*I site that lies within the tetracycline-resistance gene. Therefore, both pMW79 and Lambda 736(+) DNA were digested with *Sal*I and the digestion products were ligated together. The ligation reaction was used to transform *E. coli*, ampicillin-resistant transformants were selected, and 650 of these were then tested for sensitivity to tetracycline in order to identify recombinant plasmids. Ten *Amp^r* Tet^s isolates were found. Plasmid DNA was extracted from these transformants and analyzed by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis. The recombinant of interest was found. This plasmid, containing the cloned 9 kb *Sal*I fragment, was designated pAS9. (Figure 8).

This plasmid was transferred into *X. campestris* to look for complementation of the X736 Gum- defect. Plasmid pAS9 was mobilized into a rifampicin-resistant derivative of X736, designated X1017, and the Rif^r wild-type (Gum+) strain X77. These mobilizations were performed as standard triparental conjugal transfers directed by pRK2013. *X. campestris* conjugants carrying the plasmid of interest were selected by plating on rifampicin (to select against the *E. coli* donor and mobilizer strains) and streptomycin (to select for the presence of pAS9). The Rif^r and Strep^r progeny of the mating of pAS9 into X1017 were exclusively Gum+. Three Gum+ derivatives were chosen and examined for plasmid. It was found that all three clearly contained the plasmid pAS9 and that the plasmid had not undergone

SUBSTITUTE SHEET



any obvious rearrangement, as determined by restriction endonuclease digestions. Furthermore, a plasmid "curing" experiment was performed. In this experiment, X1017 pAS9 was grown up

under conditions which promote loss of plasmids and then plated out in the absence of any drugs that would select for the plasmid. Significant frequencies of gum- colonies were observed in such platings. Three such gum- isolates were examined and it was found that plasmid pAS9 had been lost. However, three gum+ isolates from such experiment were all found to retain pAS9. The correlation between presence of the plasmid and the gum+ phenotype argues that the gum+ property is not due to recombinantion but rather to expression of the plasmid-borne gene. Since mutant X736 can produce UDP-glucose but not UDP-glucuronic acid, it most certainly is defective in the single enzyme UDP-glucose dehydrogenase responsible for the conversion of UDP-glucose to UDP-glucuronic acid. The gene for this enzyme is contained on plasmid pAS9.

Example 6

This example demonstrates complementation of the mutations in strains X652, X711 and X712 by plasmid pAS7.

A lambda library of *X. campestris* genomic DNA was probed with plasmid pTX652 derived by cloning the transposon Tn10 plus flanking chromosomal sequences from the sugar nucleotide mutant X652 into plasmid RSF1010. Mutant X652 does not make UDP-glucose, GDP-mannose or UDP-glucuronic acid. Recombinant phage which hybridized to pTX652 were plaque-purified. Southern blots of restriction digests of these phage, probed with pTX652, identified a 9kb BamHI fragment which contained wild-type sequence corresponding to the site of the transposon insertion.

This 9kb BamHI fragment was purified and ligated into the BamHI site of plasmid pMW79. The ligation mixture was used to transform *E. coli*, and ampicillin-resistant transformants were selected. These were screened for sensitivity to tetracycline; insertion of foreign DNA into the BamHI site of pMW79 will inactivate the gene encoding resistance to tetracycline. Plasmid pAS7 containing the 9kb BamHI fragment was obtained by this procedure (Figure 9).

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

The plasmid was then transferred to X. campestris strain X1043 from E. coli by a triparental conjugal transfer directed by PRK2013. X. campestris X1043 was obtained by mating PTX652 into X. campestris strain X77 (a rifampicin-resistant mutant obtained from X. campestris NRRL B1459 S4-L) and forcing homologous recombination by imposing tetracycline selection.

The different antibiotic resistance of X1043 from X652 facilitated counterselection against the E. coli donor in subsequent matings. After transfer of plasmid pAS7, X1043 was restored to a gum+ phenotype. This phenotype reverted to gum- when the strain was cured of pAS7, indicating that the gum+ phenotype was due to expression of the plasmid-borne copy of the chromosomal gene inactivated by transposon insertion in strain X652. As shown in Example 3, the mutations in strains X652, X711 and X712 are clustered on the X. campestris chromosome. Plasmid pAS7 restored the gum+ phenotype upon transfer into mutants X711 and X712 by conjugation in a triparental mating. Complemented strains which lost the plasmid, became gum-. Strains X711 and X712 are unable to synthesize GDP-mannose, as is strain X652. Plasmid pAS7 restores this ability, and so contains the gene(s) encoding the enzyme(s) required for synthesis of GDP-mannose.

Strain X652 is also deficient in UDP-glucose. This defect is consistent with the lack of phosphoglucomutase in strain X652 (Example 2). The same linkage group which contains genes coding for enzymes required for GDP-mannose biosynthesis, also contains the structural gene for phosphoglucomutase or a regulatory gene controlling expression of phosphoglucomutase. Example 7
This example describes sugar nucleotide pools in the alternative hosts.

The sugar nucleotides in Paracoccus denitrificans (ATCC 17741), Pseudomonas stutzeri (ATCC 17588), and Pseudomonas perfectomarina (ATCC 14405) were analyzed using procedures developed for X. campestris. All organisms were grown for twelve hours with two percent glucose as the carbon source. Cells were collected, washed, and resuspended to an absorbance at 600 nm of 100. The cell pellets had a pink hue typical of



dentrifying bacteria which have depressed synthesis of the cytochromes required for anaerobic growth (a typical response to oxygen limitation during growth). Consequently, 25 mM nitrate was included as an additional electron acceptor in the incubation mixtures. Cell suspensions were incubated with 20 mM glucose for five minutes with and without nitrate, then extracted with formic acid as described in Example 1. Extracts were lyophilized, dissolved in TEA-phosphate buffer and analyzed by HPLC. *Paracoccus denitrificans* had UDP-glucose and GDP-mannose, but undetectable amounts of UDP-glucuronic acid, as verified by spectra of peaks in the regions of interest (Figures 10-12).

Similarly, *Pseudomonas perfectomarina* and *Pseudomonas stutzeri* had UDP-glucose and GDP-mannose. UDP-glucuronic acid was not detected in extracts from either organism. It is intended to insert plasmid PAS9, described in Example 5, into all three bacteria by conjugation from an *E. coli* donor in a triparental mating to correct the inability of these strains to synthesize UDP-glucuronic acid.

Example 8

This example describes UDP-glucose pyrophosphorylase activity in *X. campestris* transposon-induced mutants defective in sugar nucleotide synthetases.

Strain X649 was unable to make UDP-glucose (Example 1) but had phosphoglucomutase activity (Example 2). The experiments described below demonstrate that the mutation in this strain affects UDP-glucose pyrophosphorylase activity, and that the gene for UDP-glucose pyrophosphorylase is contained on plasmid PTS13.

To facilitate analysis of UDP-glucose pyrophosphorylase activity, three streptomycin-sensitive, rifampicin-resistant strains that carried the Tn10 insertion of strain X649 were constructed. One such strain, X1023, was constructed by the gene replacement procedure described by Capage et al., supra. Two other strains, X1024 and X1025, were constructed by chromosome mobilization. Plasmid PTS13 which complements the sugar nucleotide defect of strain X649 (Example 4) was inserted into X1023, X1024 and X1025 to obtain strains X1041, X1039 and X1040, respectively. Also, plasmid PTS13 was inserted into the gum⁺ rifampicin-resistant strain X77, to create strain X1052.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

Cytoplasmic fractions were prepared as described in Example 2 from these strains and *X. campestris* X77, which served as a positive control. UDP-glucose pyrophosphorylase converts glucose-1-phosphate and UTP to UDP-glucose and pyrophosphate. The reaction is reversible. UDP-glucose pyrophosphorylase activity was measured by coupling formation of glucose-1-phosphate from UDP-glucose to reduction of NAD or NADP by adding phosphoglucomutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, as described by Lieberman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:625-632 (1970), specifically incorporated herein by reference. In these assays HEPES buffer was used instead of Tris, and sodium phosphate was omitted from the reaction mixture. Sodium fluoride (5 mM) was added to inhibit pyrophosphatase activity.

In an experiment where NAD was used, strain X1023 had UDP-glucose pyrophosphorylase activity of 5.4 nmol per protein per minute, less than 10% of the UDP-glucose pyrophosphorylase activity of wild-type strain X77, 72.2 nmol per minute. Almost all of the increase in absorbance at 340 nm in the X1023 reaction mixture was due to competing reactions, rather than UDP-glucose pyrophosphorylase activity itself. Strain X1039 had UDPG pyrophosphorylase activity of 18.7 nmol per minute, fourfold higher than activity in X1023. This result demonstrates that plasmid pT513 carries the UDP-glucose pyrophosphorylase gene.

To verify that pT513 carries the UDP-glucose pyrophosphorylase gene, additional experiments were carried out with the other mutants, using NADP as the electron acceptor. Results are summarized in Table 3. Results of multiple determinations at different extract concentrations are presented.

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 12.5 million, and the number of people aged 75 and over has increased from 4.5 million to 6.5 million (Office of National Statistics 2000). The number of people aged 65 and over is projected to increase to 15.5 million by 2020, and the number of people aged 75 and over to 8.5 million (Office of National Statistics 2000). The increase in the number of people aged 65 and over is expected to be due to a combination of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system. The number of people aged 65 and over who are in need of health and social care services is expected to increase significantly in the coming years. This is due to a number of factors, including a decline in the birth rate, a decline in the death rate, and a decline in the rate of emigration. The increase in the number of people aged 65 and over is expected to have a significant impact on the UK's health and social care system.

Table 3. UDP-glucose pyrophosphorylase activity in cytoplasmic fractions of *X. campestris*, expressed as nmol NADPH₂ formed per minute per mg protein.

Strain	UDP-glucose pyrophosphorylase
X77	6.74, 3.46, 3.18
X1023	1.83
X1024	1.12
X1025	0.57
X1040	23.0, 8.83
X1041	41.1, 45.9, 42.6, 39.3
X1052	40.3, 42.1, 43.8

Strains X1023, X1024 and X1025 had little or no pyro-

phosphorylase activity. Strains X1040 and X1041, containing the plasmid complementing the defect in strains X1025 and X1023, had high activity. Similarly, strain X1052 had much higher activity than the wild-type parent, X77, without plasmid pTS13. Because pTS13 is derived from plasmid RSF1010, a high copy number plasmid, this difference in activity may reflect a gene dosage effect. Cytoplasmic extracts of strains X77 and X1040 were prepared again and assayed immediately for pyrophosphorylase activity, this time in a spectrophotometer equipped with a constant temperature sample compartment. The specific activities were 149 and 53.4 nmol per mg protein per minute for X77 and X1040, respectively.

These results confirm that the mutation in X649 prevents UDP-glucose synthesis by eliminating UDP-glucose pyrophosphorylase activity. This activity can be restored by plasmid pTS13, which must carry the gene for UDP-glucose pyrophosphorylase.

UDP-glucose pyrophosphorylase activity was also measured in cytoplasmic extracts from the Tn903 series of sugar nucleotide mutants. Reaction mixtures did not include NaF. Results are presented in Table 4.



Table 4. UDP-glucose pyrophosphorylase activity (UDPG Pcase, expressed as nmol per minute per mg protein) in extracts of Tn903 sugar nucleotide mutants previously assayed for phosphoglucomutase activity (PGM).

Strain	Missing Sugar Nucleotides	UDPG Pcase
X77		9.4
X826	UDP-GlcA	10.5
X871	UDP-GlcA	31.1
X828	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-man	28.5
X866	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-man	17.3
X869	GDP-Man	5.88
X872	UDP-Glc, UDP-GlcA	86.2

All strains had measurable pyrophosphorylase activity. The absence of phosphoglucomutase activity is sufficient to account for the inability of strains X828, X866, and X872 to synthesize UDP-glucose.

Example 9

This example describes phosphomannomutase activity in *X. campestris* transposon-induced mutants defective in sugar nucleotide synthesis.

Cytoplasmic extracts from previously identified sugar nucleotide mutants (Example 1) were prepared as described in Example 2. These extracts were assayed for phosphomannomutase (PM), the enzyme that converts mannose-6-phosphate to mannose-1-phosphate, a substrate for GDP-mannose pyrophosphorylase. The enzyme activity is reversible. The assay (Table 5) was adapted from that of Pindar and Bucke, *Biochem. J.* 152:617-622 (1975), specifically incorporated herein by reference, in which formation of mannose-6-phosphate is coupled to NADP reduction by addition of the enzymes phosphomannose isomerase (PMI), phosphoglucose isomerase (PGI), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD).

Table 5. Reaction mixture for measurement of phosphomannomutase activity in *Xanthomonas campestris*

Solution		ml
10 mM NADP		0.10
10 mM mannose-1-phosphate		0.10
1 mM glucose-1,6-diphosphate		0.02
coupling enzymes ¹		0.02
100 mM cysteine HCl		0.05
100 mM HEPES buffer, pH 7.9		0.50
water and extract		0.21

¹From a mixture of 0.10 ml PMI (380 units/ml), 0.05 ml PGI (2000 units/ml), and 0.05 ml G6PD (1000 units/ml), where one unit will convert 1.0 μ mole per minute of substrate to product.

Reaction rates became linear after several minutes, the time required for the phosphorylated sugar intermediates to reach steady-state concentrations. These linear rates are proportional to the amount of cytoplasmic extract included in the reaction mixture. For convenience, PMM activity was determined by comparing NADPH₂ formation in the presence of mannose-1-phosphate versus that in its absence after a thirty minute incubation, rather than by determining actual reaction rates.

Absorbance at 340 nm was measured after thirty minutes' incubation without and with mannose-1-phosphate (M1P). Results are summarized in Table 6.

Table 6. Phosphomannomutase activity in cytoplasmic extracts of sugar nucleotide mutants unable to synthesize GDP-Mannose. Absorbance at 340 nm was measured after thirty minutes' incubation without and with mannose-1-phosphate (MIP).

Strain Sugar Nucleotide Defects MIP-dependent Increase In Abs

at 340 nm

652	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	yes
711	GDPMan	yes
712	GDPMan	yes
828	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	yes
866	GDPMan, UDPGlc, UDPGlcA	no
869	GDPMan	yes

Initially X866 extracts showed an increase in absorbance at 340 nm after addition of mannose-1-phosphate. However, this increase cannot be attributed to phosphomannomutase activity; the reaction rate was not linear, and a plateau was reached well below the maximum absorbance obtainable. The extract of X866 was still active when assayed for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (0.77 micromoles per ml per minute). Strain X866 clearly is defective in PMM activity.

All other GDP-mannose mutants had phosphomannomutase activity. The defective enzyme preventing synthesis of GDP-mannose in these mutants must be GDP-mannose pyrophosphorylase. Since the defect in mutants X652, X711 and X712 which prevents GDP-mannose synthesis is corrected by plasmid pAS7, this plasmid must carry the gene for GDP-mannose pyrophosphorylase.

It will be apparent to those skilled in the art that various modifications and variations can be made in the processes and products of the present invention. Thus, it is intended that the present invention cover the modifications and variations of this invention provided they come within the scope of the appended claims and their equivalents.



WHAT IS CLAIMED IS:

1. A recombinant-DNA mediated method for the production of sugar nucleotides comprising:

(a) preparation of at least one portable DNA sequence capable of directing an alternate host microorganism to produce at least one sugar nucleotide;

(b) cloning the portable DNA sequence into at least one vector capable of being transferred into and replicating in a host microorganism, such vectors containing elements for the expression of the biosynthetic enzymes encoded by the portable DNA sequences;

(c) transferring the vectors containing the portable DNA sequences into a host microorganism capable of producing at least one sugar nucleotide under the direction of the portable DNA sequences;

(d) culturing the host microorganism under conditions appropriate for maintenance of the vectors and synthesis of the sugar nucleotide; and optionally

(e) harvesting the sugar nucleotide.

2. The method of claim 1 wherein the sugar nucleotide to be produced is UDP-glucose.

3. The method of claim 1 wherein the sugar nucleotide to be produced is UDP-glucuronic acid.

4. The method of claim 1 wherein the sugar nucleotide to be produced is GDP-mannose.

5. The method of claim 1 wherein the vector is selected from the group consisting of PAS7, PAS9 and PTS13.

6. The method of claim 1 wherein said host comprises a denitrifying bacterium.

7. The method of claim 1 wherein said host is selected from the bacteria of the genus Clostridium.

8. The method of claim 1 wherein said host is selected from the group consisting of Pseudomonas putida, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas denitrificans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri, Escherichia coli, and Enterobacter cloacae.

9. An article of manufacture comprising at least one plasmid capable of directing a microbial cell to synthesize at least one of the enzymes selected from the group consisting of UDP-glucose pyrophosphorylase, UDP-glucose dehydrogenase, phosphoglucomutase, phosphomannose mutase and GDP-mannose phosphorylase.

10. The plasmid pAS7.

11. The plasmid pAS9.

12. The plasmid pTS13.

13. A plasmid capable of directing microbial synthesis of one or more sugar nucleotides selected from the group consisting of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and GDP-mannose.

14. A microorganism of the strain X. campestris X872.

15. A microorganism of the strain E. coli

LE392(pAS7).

16. A microorganism of the strain E. coli

LE392(pAS9).

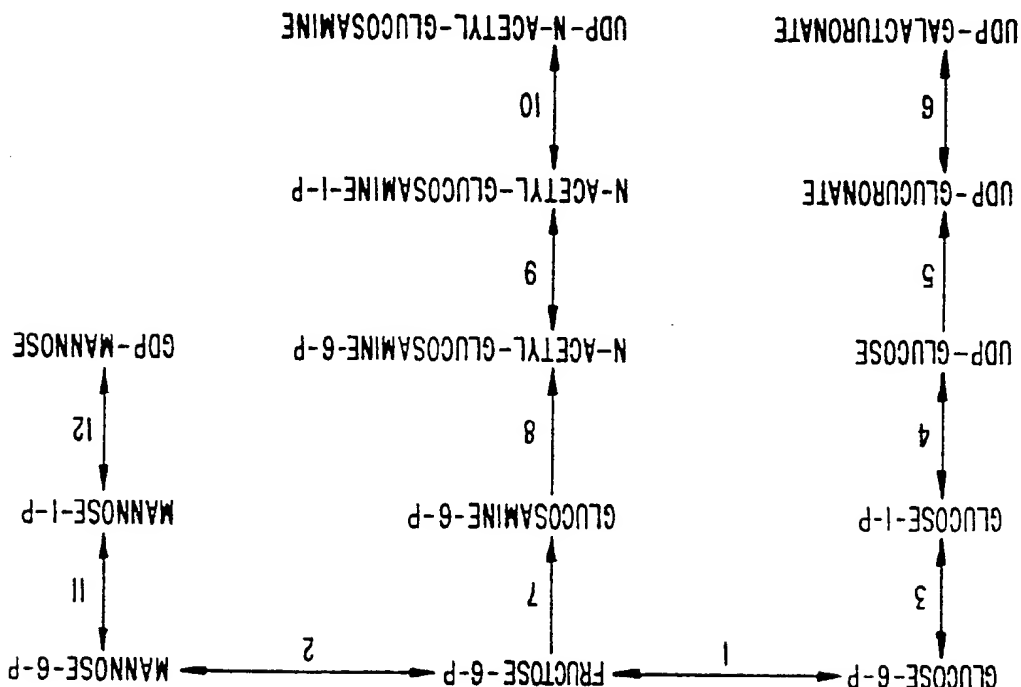
17. A microorganism of the strain E. coli

LE392(pTS13).



FIG. 1

PATHWAYS OF SUGAR NUCLEOTIDE SYNTHESIS IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*.
 UDP-GLUCOSE, UDP-GLUCURONATE, AND GDP-MANNOSE ARE XANTHAN PRECURSORS;
 UDP-GLUCOSE, UDP-GALACTURONATE, AND GDP-MANNOSE ARE LIPOPOLYSACCHARIDE
 PRECURSORS; AND UDP-N-ACETYL GLUCOSAMINE IS A CELL WALL PEPTIDOGLYCAN
 PRECURSOR.



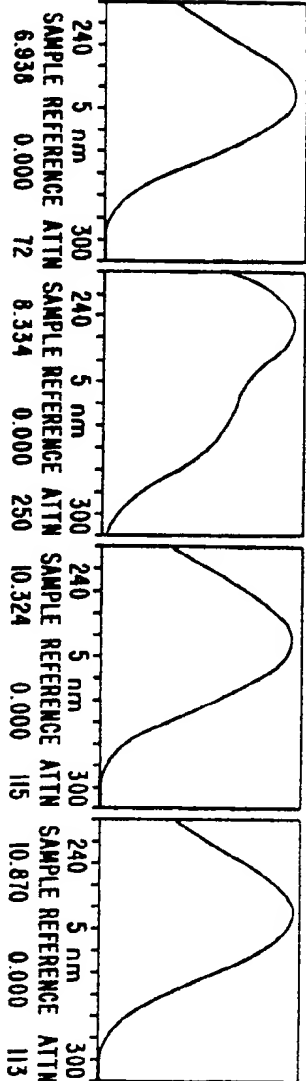
ENZYMES:

1. GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE
2. MANNOSE PHOSPHATE ISOMERASE
3. PHOSPHOGLUCOMUTASE
4. UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE
5. UDP-GLUCOSE DEHYDROGENASE
6. UDP-GLUCURONATE EPIMERASE
7. GLUCOSAMINE PHOSPHATE ISOMERASE
8. GLUCOSAMINE PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE
9. ACETYLGLUCOSAMINE PHOSPHOMUTASE
10. UDP-GLUCOSAMINE PYROPHOSPHORYLASE
11. PHOSPHOMANNOSE MUTASE
12. GDP-MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE



FILE: STD5MAR5'S
DATE: 03/05/1985

hp 1040A



UDP - GLUCOSE

GDP - MANNOSE

UDP - GALACTURONATE

UDP - GLUCURONATE

UDP - N-ACETYLGLUCOS-AMINE

INJ. TIME 14:26
ATTN. [mAU]: 100.0 (205.8)
ZERO%: 10%
SIGNAL: A: 4,8 SET M

WAVELENGTH	1	2	3	4	5	6	7	8
210	4	4	4	4	4	4	4	4
225	4	4	4	4	4	4	4	4
254	4	4	4	4	4	4	4	4
260	4	4	4	4	4	4	4	4
280	4	4	4	4	4	4	4	4
320	20	20	20	20	20	20	20	20
450	50	50	50	50	50	50	50	50
550	50	50	50	50	50	50	50	50

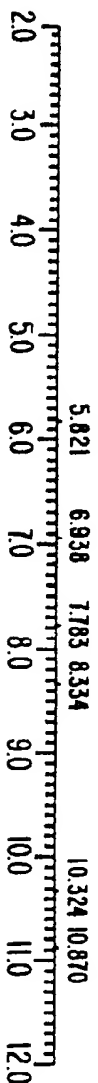


FIG. 2.

SEPARATION OF SUGAR
NUCLEOTIDE STANDARDS
BY HPLC, AS DESCRIBED
IN THE TEXT.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

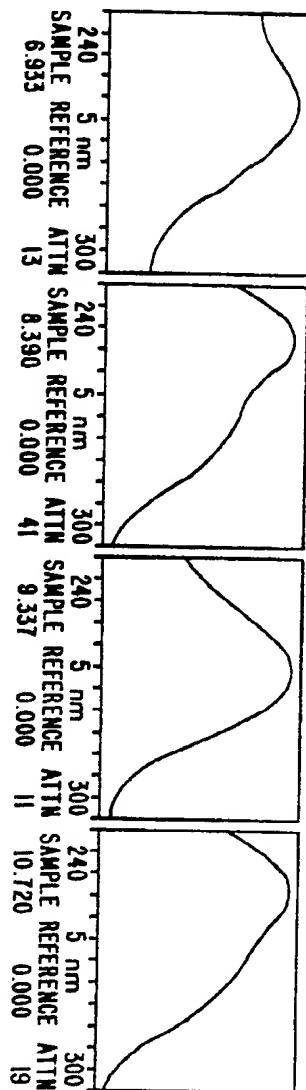
197

198

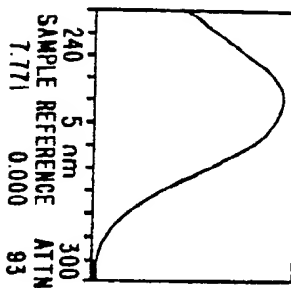
199

200

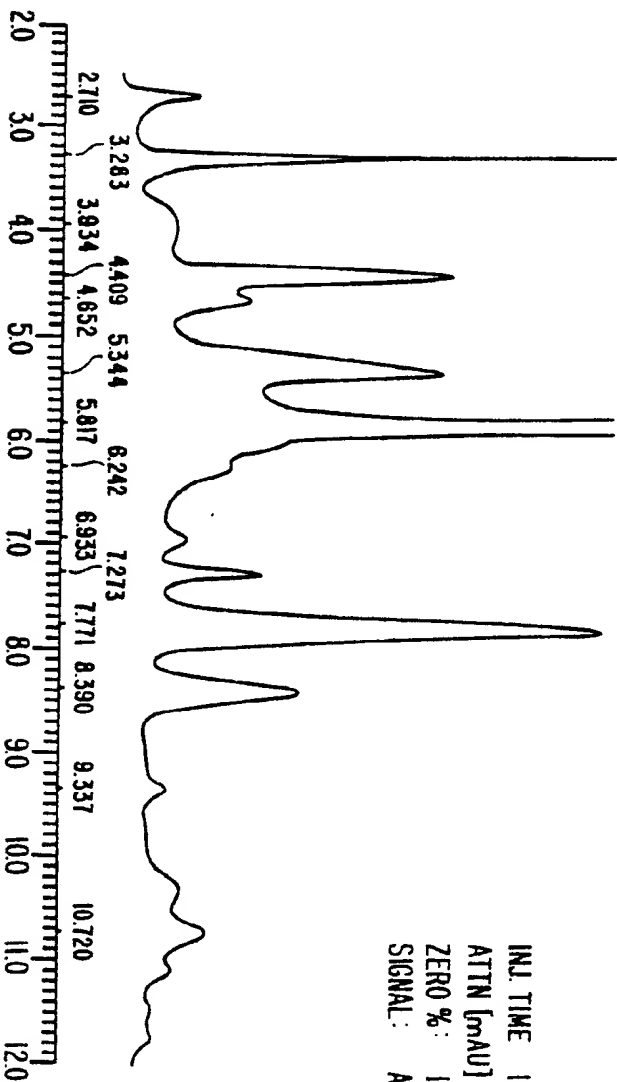
FILE: X872MAR5'S
DATE: 03/05/1985



hp 1040A



SUBSTITUTE SHEET



INJ. TIME 16:38
ATTN [mAU]: 100.0 (183.1)
ZERO %: 10%
SIGNAL: A: 4, 8 SET

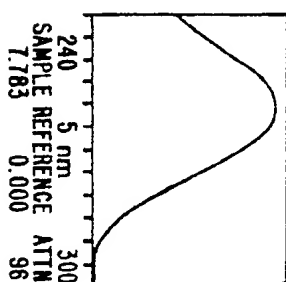
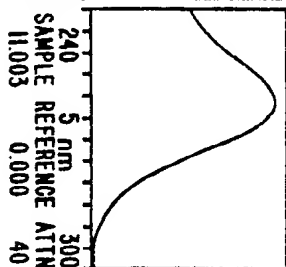
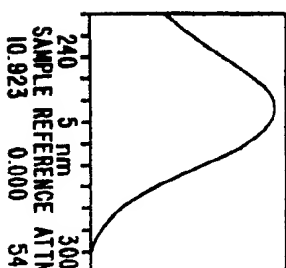
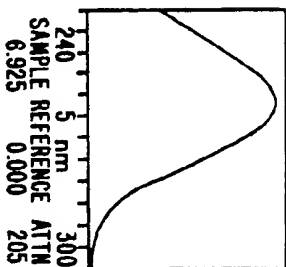
WAVELENGTH
1. 210. 4
2. 225. 4
3. 254. 4
4. 260. 4
5. 280. 4
6. 320. 20
7. 450. 50
8. 550. 50

FIG. 3.

ABSENCE OF UDP-GLUCOSE,
UDP-GALACTURONATE, AND
UDP-GLUCURONATE FROM
X. CAMPESTRIS X872.

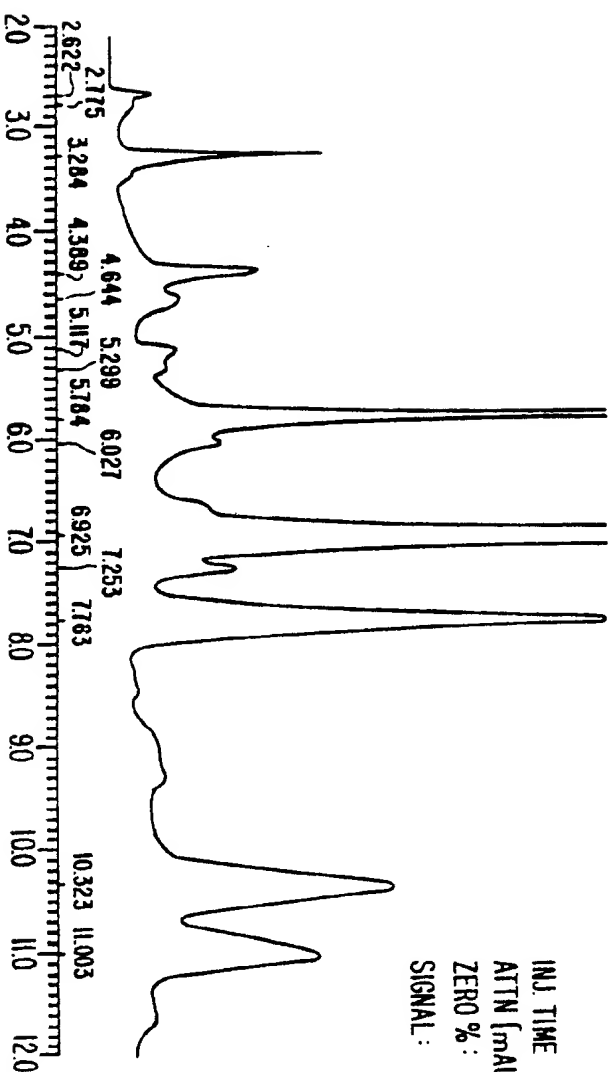
The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world. It is argued that the study of the history of the world is essential for a full understanding of the world and its people. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States and the world. It is argued that the study of the history of the United States and the world is essential for a full understanding of the United States and the world.

FILE: X869MAR5'S
DATE: 03/05/1985



hp 1040A

SUBSTITUTE SHEET



INJ. TIME 13:21
ATTN [mAU]: 100.0 (194.4)
ZERO %: 10%
SIGNAL: A: 4, 8 SET

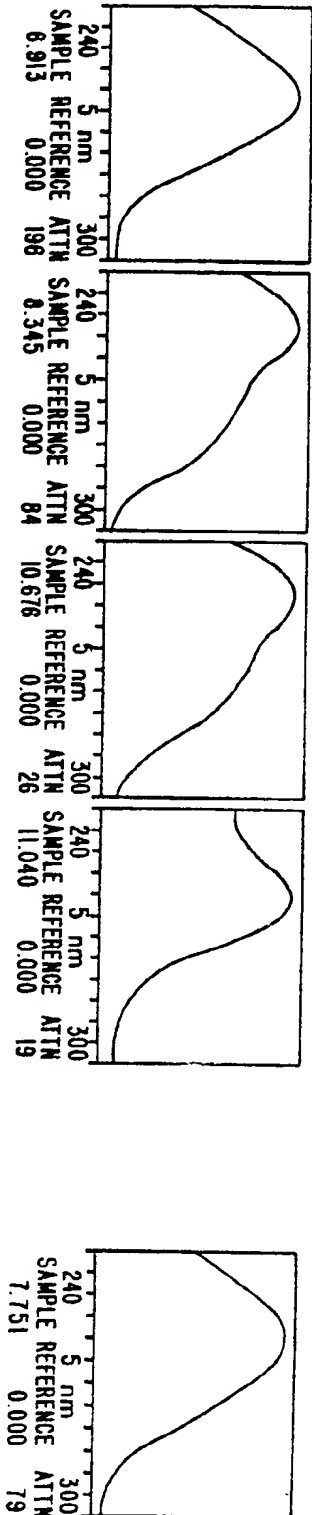
WAVELENGTH	
1. 210.	4
2. 225.	4
3. 254.	4
4. 260.	4
5. 280.	4
6. 320.	20
7. 450.	50
8. 550.	50

FIG. 4.

ABSENCE OF GDP-MANNOSE
FROM X. CAMPESTRIS X869

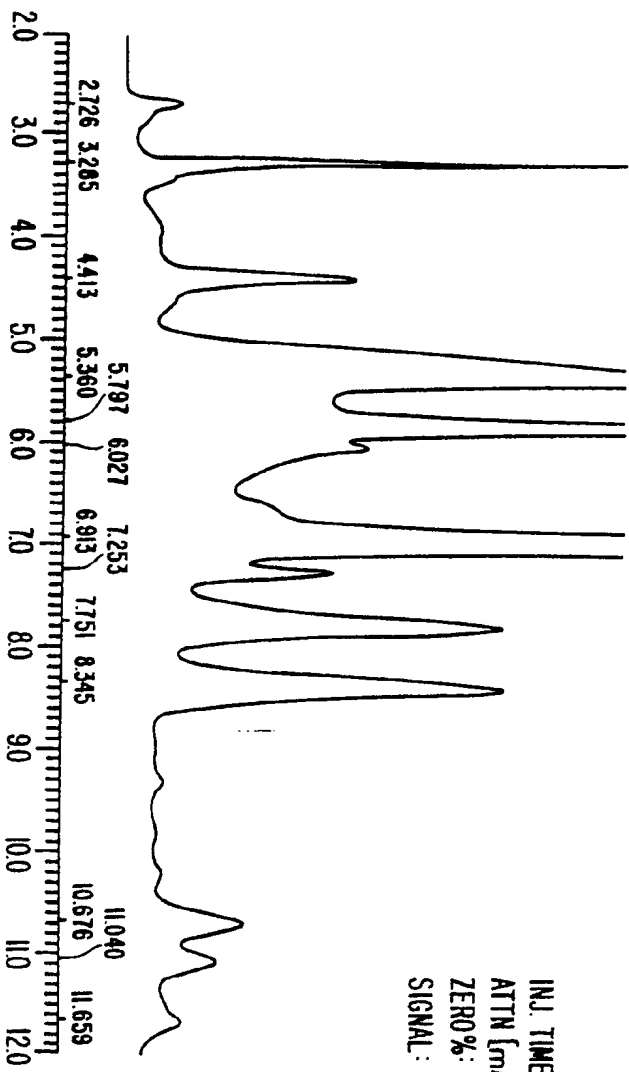


FILE: X871MAR5'5
DATE: 03/05/1985



hp 1040A

SUBSTITUTE SHEET



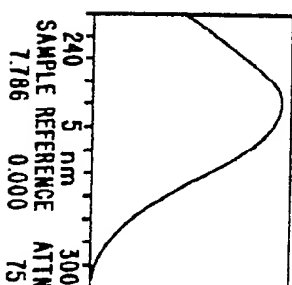
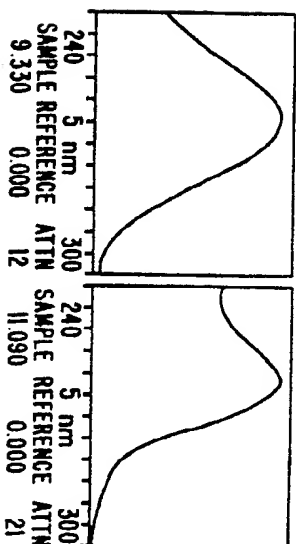
INJ. TIME: 15:34
ATTN [mAU]: 100.0 (1852)
ZERO%: 10%
SIGNAL: A:4,8 SET M

WAVELENGTH	
1.	210. 4
2.	225. 4
3.	254. 4
4.	260. 4
5.	280. 4
6.	320. 20
7.	450. 50
8.	550. 50

FIG. 5.
ABSENCE OF UDP-GALACTURO-
NATE AND UDP-GLUCURONATE
FROM X. CAMPESTRIS X871.



FILE: X866MAR5'5
DATE: 03/05/1985



INJ. TIME: 12:17
ATTN [mAU]: 100.0 (151.0)
ZERO %: 10%
SIGNAL: A: 4, 8 SET M

WAVELENGTH	
1.	210. 4
2.	225. 4
3.	254. 4
4.	260. 4
5.	280. 4
6.	320. 20
7.	450. 50
8.	550. 50

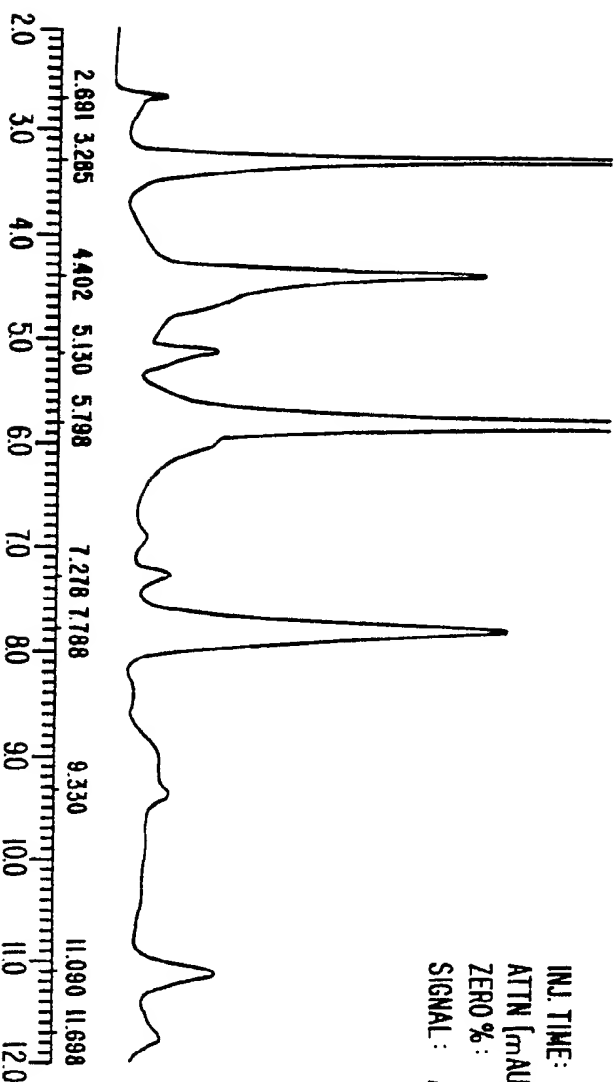


FIG. 6.

ABSENCE OF UDP-GLUCOSE,
GDP-MANNOSE, UDP-
GALACTURONATE, AND
UDP-GLUCURONATE FROM
X. CAMPESTRIS X866.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

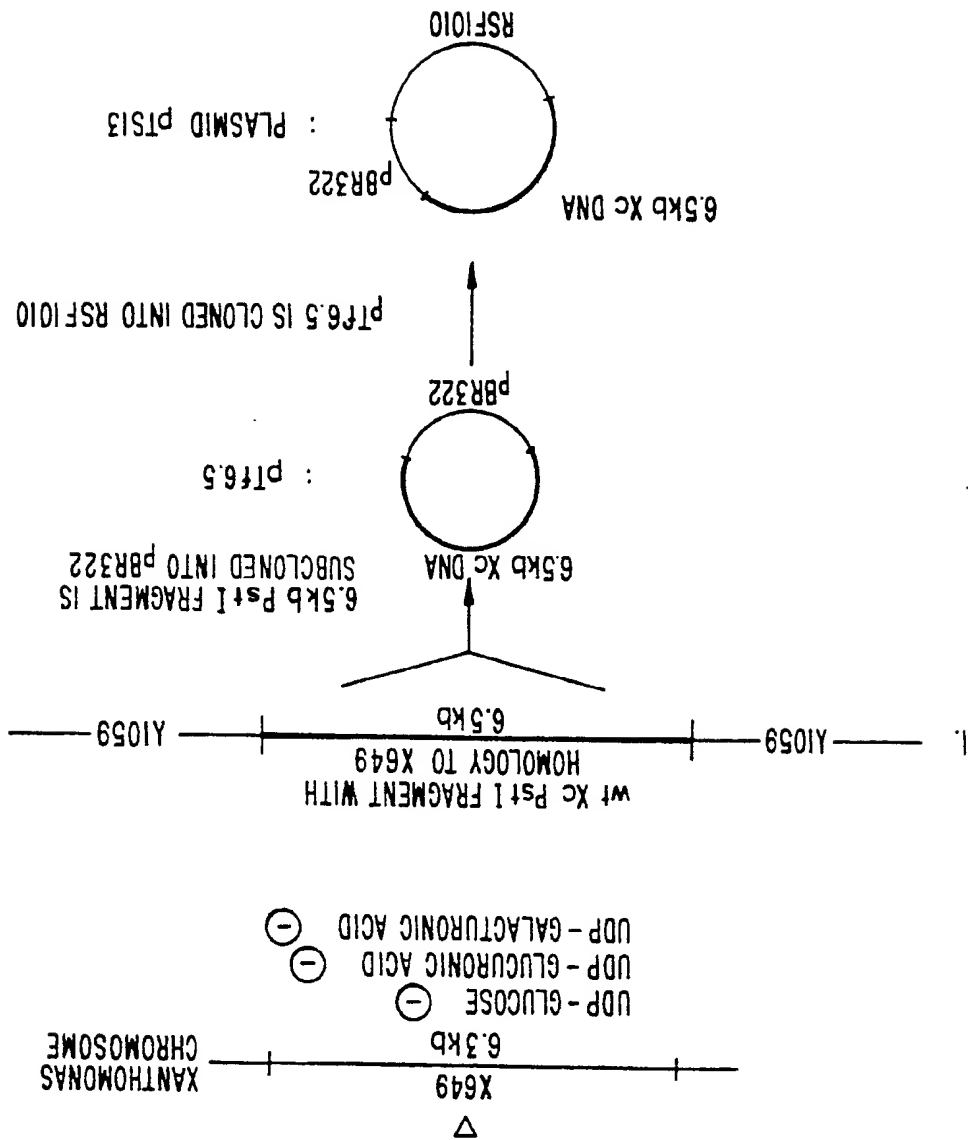
998

999

1000

III. THE UDP GLUCOSE, UDP-GLUCURONIC ACID, AND UDP-GALACTURONIC ACID MUTATION IS LOCATED ELSEWHERE ON THE XANTHOMAS CHROMOSOME, BUT NOT WITHIN THE GUM GENE CLUSTER.

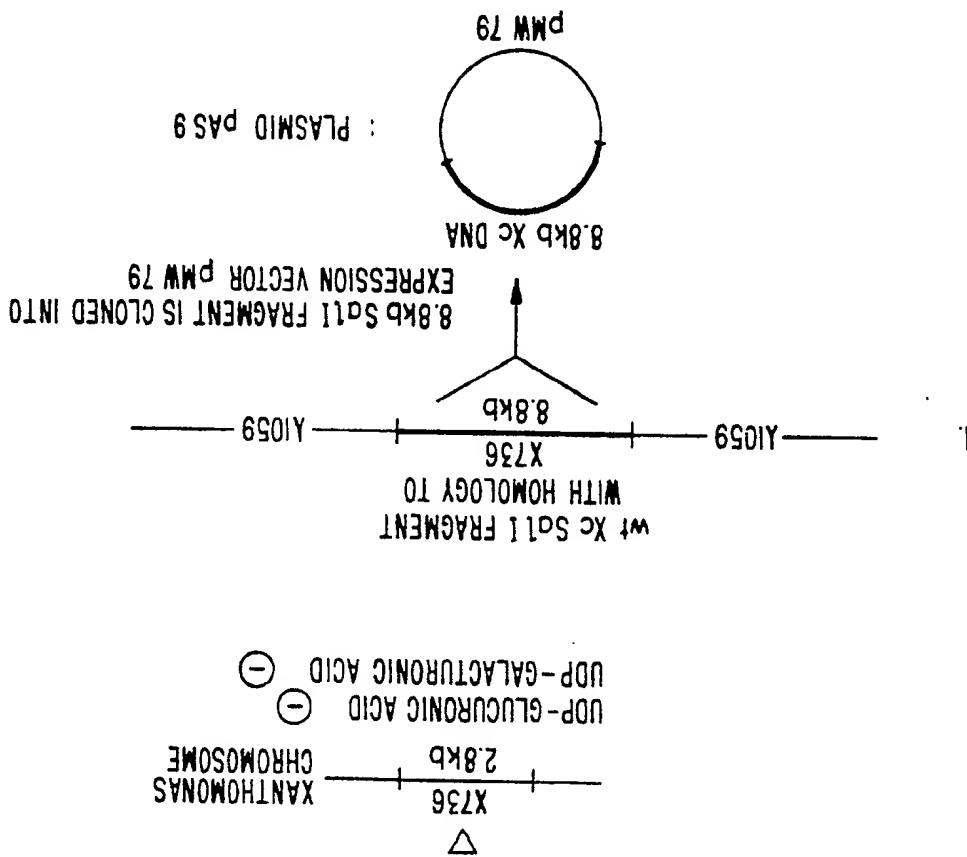
FIG. 7

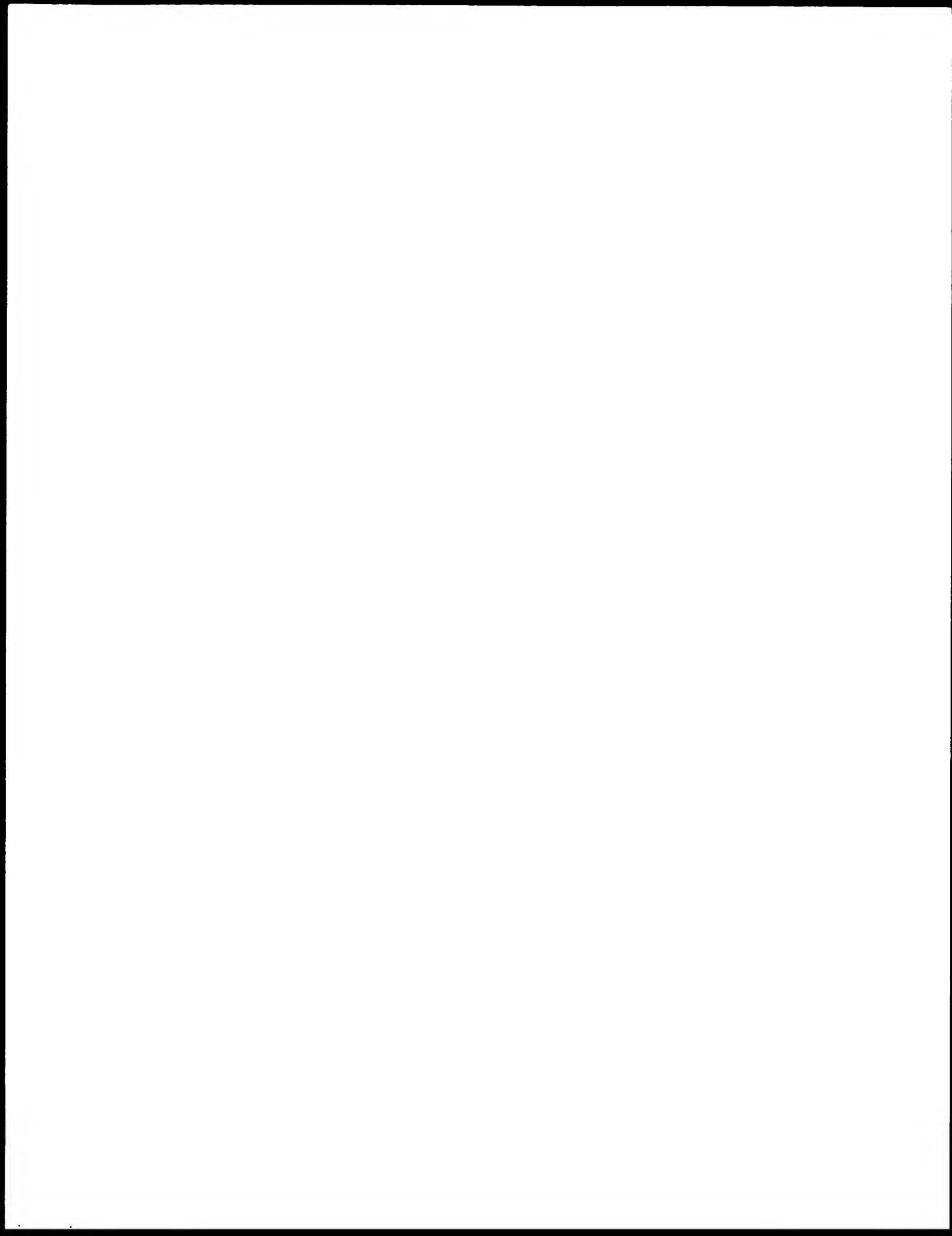


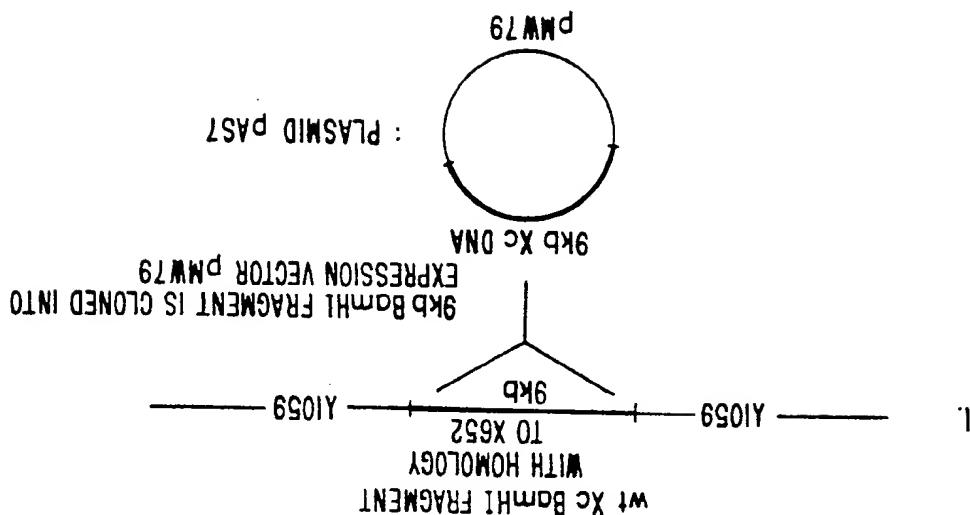


II. THE UDP-GLUCURONIC ACID AND UDP-GALACTURONIC ACID MUTATION IS LOCATED ELSE-
WHERE ON THE XANTHOMONAS CHROMOSOME, BUT NOT WITHIN THE GUM GENE CLUSTER.

FIG. 8.

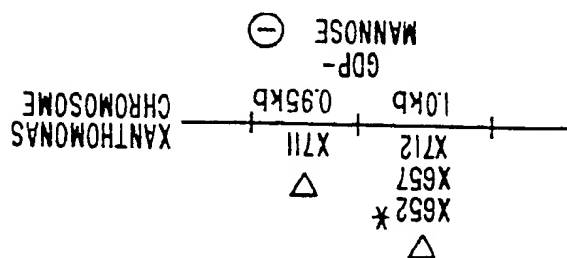






A. LARGE FRAGMENTS OF wt XANTHOMONAS CHROMOSOME ARE PACKAGED INTO Y-1059

* MUTANT X652 IS ALSO DEFECTIVE IN THE BIOSYNTHESIS OF UDP-GLUCOSE AND RELATED COMPOUNDS.



I. GDP-MANNOSE DEFECTIVE MUTANTS ARE CLUSTERED ON THE XANTHOMONAS CHROMOSOME, BUT NOT WITHIN THE REGION OF DNA CONTAINING GUM GENES.

SUGAR NUCLEOTIDE DEFECTS IN T410-INDUCED MUTANTS

FIG. 9.



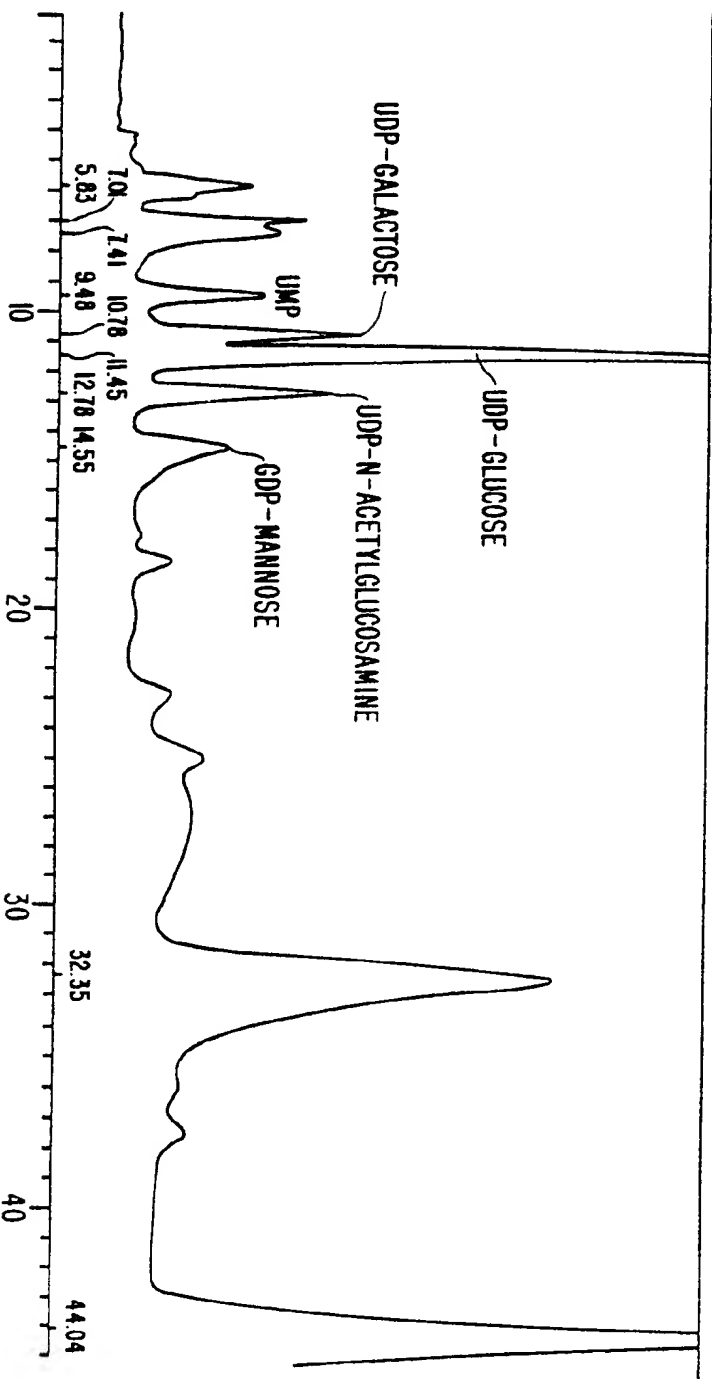
FIG. 10

CHROMATOGRAM OF AN EXTRACT FROM *PARACOCCLUS*
DENITRIFICANS INCUBATED WITH 25 mM KNO₃.

FILE: 1774IN0606
DATE: 06/07/1984
INJ. TIME: 05:00
ATTN (mul): 25.0 (286)
ZERO %: 10
SIGNAL: A: 4, 8

WAVELENGTH (nm)
1. 210. 4
2. 225. 4
3. 254. 4
4. 260. 4
5. 280. 4
6. 320. 20
7. 450. 50
8. 550. 100

hp 1040A



10/12

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

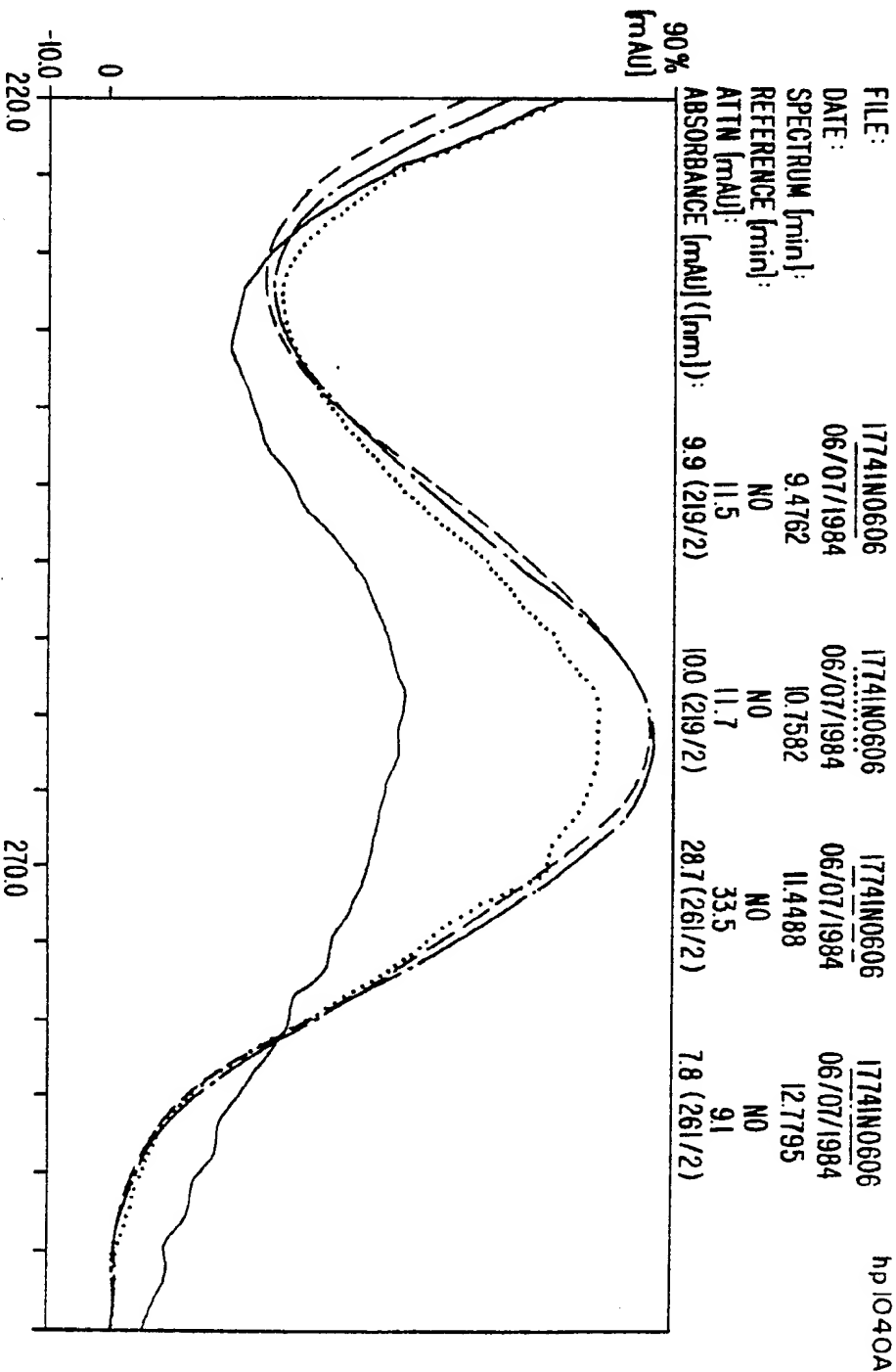
199

200

11/12

FIG. 11

SPECTRA OF COMPOUNDS FOUND IN AN EXTRACT FROM PARACOCCLUS DENITRIFICANS.
ALL NUCLEOTIDE COMPONENTS IN THIS FIGURE HAVE SPECTRA CHARACTERISTIC OF URIDINE COMPOUNDS.



SUBSTITUTE SHEET

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

FIG. 12 SPECTRA OF COMPOUNDS FOUND IN AN EXTRACT FROM PARACOCCLUS DENITRIFICANS.
NUCLEOTIDE COMPONENTS OF EACH COMPOUND HAVE BEEN IDENTIFIED BASED ON THEIR SPECTRA.

FILE: GUANOSINE ADENOSINE ADENOSINE
1774IN0606 1774IN0606 1774IN0606
hp1040A

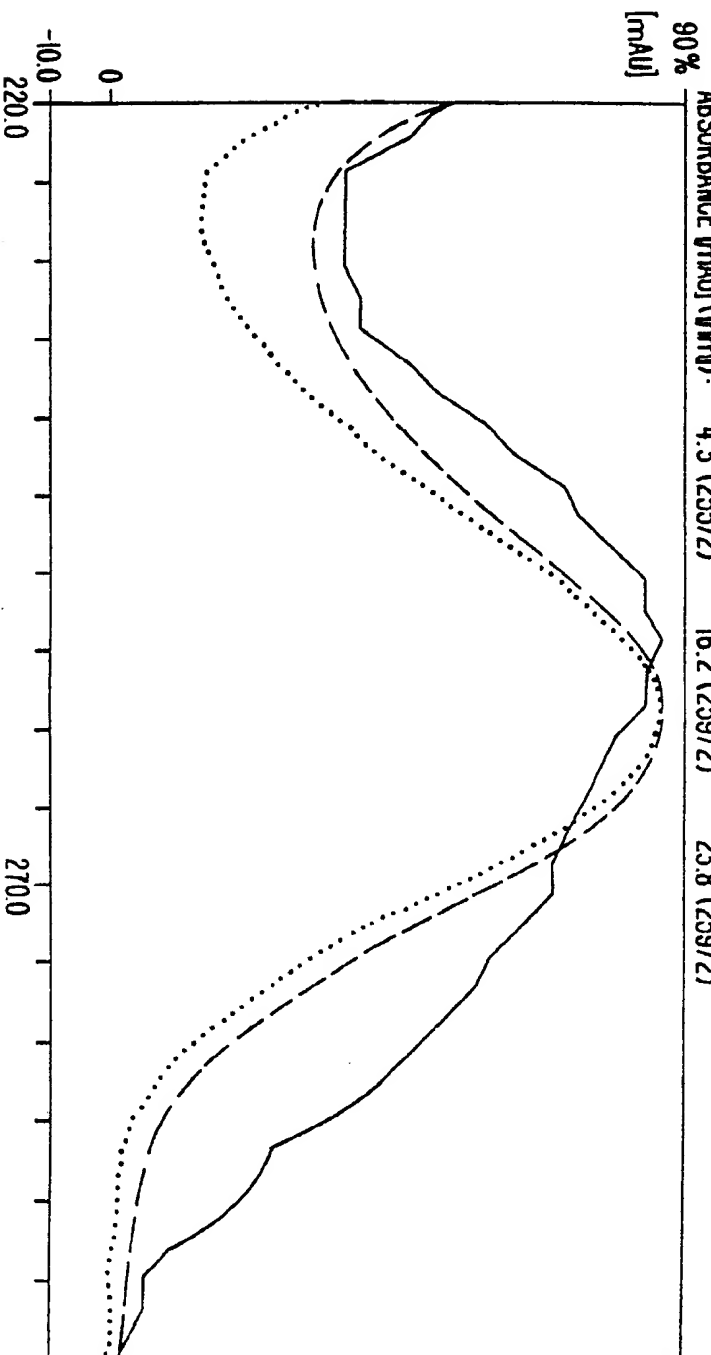
DATE: 06/07/1984 06/07/1984 06/07/1984

SPECTRUM [min]: 14.5545 32.3535 44.0382

REFERENCE [min]: NO NO NO

ATTN [min]: 5.0 18.9 27.8

ABSORBANCE [mAU] ((fml)): 4.3 (255/2) 16.2 (259/2) 23.8 (259/2)



SUBSTITUTE SHEET



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US87/00605

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all)

IPC(4): C12P 19/02, C12P 19/12, C12P 19/30, C12N 15/00, C12N 1/20;
U.S. CL: 435/72, 435/89, 90, 435/172.3, 435/253, 435/317

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched

Classification System

U.S. 435/72, 89, 90, 172.3, 253, 317, 849, 910

935/14

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the extent that such documents are included in the fields searched

CHEMICAL ABSTRACTS DATA BASE (CAS) 1967-1987: BIOLOGICAL ABSTRACTS
DATA BASE (BIOSIS) 1967-1987; KEYWORDS: SUGAR NUCLEOTIDES,
CLONING, RECOMBINANT DNA

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category * Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages 17 Relevant to Claim No. 18

X, P	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, (Washington, D.C.), Volume 169, issued January 1987, (DERETIC ET AL), "Gene algD coding for GDP mannosyl dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoid Pseudomonas aeruginosa", See pages 351-358.	1, 4 2, 3, 5-17
X	DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (New York, NY), Volume 110, issued August 1985, (FISHEL ET AL), "Molecular cloning of a cDNA complementary to a UDP-glucose pyrophosphorylase mRNA of Dictyostelium discoideum", See pages 369-381.	1, 2 3-17
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (Bethesda, MD, USA), Volume 259, issued 10 January 1984, (COUTO ET AL), "Cloning and expression in Escherichia coli of a yeast mannose-1-phosphatase from the asparagine-linked glycosylation pathway", See pages 378-382.	1-17

* Special categories of cited documents: 15
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
IV. CERTIFICATION
"A" later document published after the international filing date cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"Z" document member of the same patent family

Date of the Actual Completion of the International Search

12 June 1987

Date of Mailing of this International Search Report

22 JUN 1987

ISA/US

International Searching Authority

Thomas Mays

Signature of Authorized Officer



III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
----------	--	-----------------------

Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (Bethesda, MD, USA), Volume 254, issued 10 February 1979, (CREEGER ET AL.), Cloning of genes for bacterial glycosyltransferases: 1. Selection of hybrid plasmids carrying genes for two glucosyltransferases", See pages 804-810.	1-17
---	--	------





<p>(51) 国際特許分類6 C12P 19/26, C12N 1/21, 15/54, 5/16 // (C12P 19/26, C12R 1:19, 1:15)</p> <p>A1</p> <p>(11) 国際公開番号 WO98/12343</p> <p>(43) 国際公開日 1998年3月26日(26.03.98)</p>	<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03226</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月12日(12.09.97)</p> <p>(30) 優先権主張 特願平8/244451 特願平8/285066</p> <p>1996年9月17日(17.09.96) 1996年10月28日(28.10.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国の指定国について) 協和醸造工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国の指定国についてのみ) 小泉聡司(KOIZUMI, Satoshi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市中原3-9-10 Tokyo, (JP) 佐々木克敏(SASAKI, Katsutoshi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市本町1171-3-201 Tokyo, (JP) 遠藤徹二(ENDO, Tetsuo)[JP/JP] 〒194 東京都町田市森野4-17-17 Tokyo, (JP) 田畑和彦(TABATA, Kazuhiko)[JP/JP] 〒194 東京都町田市森野4-17-9 Tokyo, (JP)</p>
<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーライア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p>	<p>(54) Title: PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES</p> <p>(54) 発明の名称 糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法</p> <p>(57) Abstract A process for producing sugar nucleotides with the use of, as enzyme sources, a) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing NTP from a nucleotide precursor, and b) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from a sugar and NTP; a process for producing complex carbohydrates with the use of, as enzymes sources, the above-mentioned cultures a) and b), and c) an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; a process for producing complex carbohydrates with the use of, as enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; and a process for producing N-acetylglucosamine-1-phosphate with the use of, as an enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism having a potent galactokinase activity.</p>

本発明は、a)ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物およびb)糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いた糖ヌクレオチドの製造法、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用いた複合糖質の製造法、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いた複合糖質の製造法およびガラクトキナーゼ活性の強い微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いたヌーアセチルグルコサミン-1-リン酸の製造法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のバリエーション第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LI	スイス	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AN	アンдорラ	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
AT	オーストリア	GB	英国	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LK	スリランカ	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ギニア	MG	マダガスカル	SS	南スーダン
BB	バルバドス	GN	ギニアビサウ	MD	モルドバ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GW	ギニアビサウ	ME	モンテネグロ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BS	バハマ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
BT	ブータン	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
BZ	ベリーズ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CA	カナダ	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CC	ココス (キリング) 島	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CD	コンゴ民主共和国	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ共和国	KG	キルギス	NZ	ニュージーランド		
CG	コンゴ共和国	KR	韓国	PL	ポーランド		
CH	スイス	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CN	中国	LA	ラオス	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	LC	セント・ルシア	RU	ロシア連邦		
CZ	チェコ	RE	レユニオン	SD	スーダン		
DE	ドイツ	SC	セント・ヘレナ				
DK	デンマーク						
EE	エストニア						

明 細 書

糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

技術分野

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療等に有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの製造方法に関する。

背景技術

糖ヌクレオチドの製造方法として、1) 化学合成法 [Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307 (1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275 (1973)、J. Org. Chem., 57, 146 (1992)、Carbohydr. Res., 242, 69 (1993)]、2) 酵素を用いた製造方法 [J. Org. Chem., 55, 1834 (1990)、J. Org. Chem., 57, 152 (1992)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)、特表平7-508413、特表平7-500248、W096/27670]、3) 酵母等の微生物菌体を用いる方法 (特公昭45-2073、特公昭46-40756、特公昭47-1837、特公昭47-26703、特公昭49-8278、特開平2-268692) 4) 耐塩性酵母の微生物菌体からの抽出法 (特開平8-23993) 等が知られている。

1) の方法においては、高価なヌクレオシド-5'-一リン酸 (以下、NMPと略す) のモルフォリテート誘導体や糖リン酸等が必要であり、2) の方法においては、ヌクレオシド-5'-二リン酸 (以下、NDPと略す)、ヌクレオシド-5'-三リン酸 (以下、NTPと略す)、ホスホエノールピルビン酸、糖リン酸等の高価な原料やピルビン酸キナーゼ等多数の酵素が必要であり、3) の方法においては菌体の乾燥処理等が必要である。4) の方法を含め、上記いずれの方法においても、原料として高価なヌクレオチドや糖リン酸等が用いられていたり、操作的に大量生産が困難であるため、今日に至るまで、糖ヌクレオチドの工業的規模での製造法は確立されていない。

複合糖質の製造法としては、(1) 化学合成法 [Methods in Enzymol., 247, 193 (1994), Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 21, 155 (1982), Carbohydr. Res., 211, c1 (1991)], (2) 加水分解酵素 [Anal. Biochem., 202, 215 (1992), Trends Biotechnol., 6, 256 (1988)] を用いる方法、および (3) 糖転移酵素 (特開平 7-79792、特表平 7-500248、特公平 5-82200、W094/25614、特表平 9-503905、USP 5,583,042) を利用した方法が知られている。

1) の方法では立体選択的合成のためには保護基の導入が必須であり、2) の方法では収率・選択性が十分でなく、3) の方法においては NDP、NTP、ホスホエノールピルビン酸、糖リン酸、あるいは糖ヌクレオチド等の高価な原料やピルビン酸キナーゼ等多数の酵素が必要であり、いずれの方法においても複合糖質の安価な工業的製造方法は確立されていない。また、安価なヌクレオチドの前駆物質および糖および複合糖質前駆物質のみを原料として、直接複合糖質を工業的に製造する方法は知られていない。

コリネバクテリウム属に属する微生物において、オロト酸を添加することにより UMP が生産されたとの報告がある [Amino Acid Nucleic Acid, 23, 107 (1971)]。また、オロト酸を原料にしてシチジンリン酸コリンを生成する方法も知られている (特開平 5-276974)。

発明の開示

本発明の目的は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療等に有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの安価で効率的な製造方法を提供することにある。

本発明者らは、微生物を用いて、ヌクレオチドの前駆物質を原料とした複合糖質および糖ヌクレオチドの生産について鋭意検討を行った結果、ヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料として糖ヌクレオチドが効率的に生産できること、糖ヌクレオチドの生成に関与する遺伝子の発現を強化することにより、その生産性が向上することを見だし、さらに、該糖ヌクレオチドを生産可能な微生物、

および、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞を利用し、ヌクレオチドの前駆物質および糖および複合糖質前駆物質のみを原料として効率的に複合糖質を生産できることを見いだし本発明を完成するに至った。

本発明は、a)ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、b)糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびc)糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆物質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法、a)ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb)糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質および上記に記載の糖ヌクレオチドの製造法により得られた糖ヌクレオチドを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法を提供する。更に、ガラクトキナーゼ活性の強い微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を採取することを特徴とするN-アセチル

ルグルコサミン-1-リン酸の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は発現プラスミドpPA31およびpPAC31の造成工程を示す。
第2図はgalU、ppa遺伝子発現プラスミドpNT12およびpNT32の造成工程を示す

第3図はgalT、galK遺伝子発現プラスミドpNT25の造成工程を示す。
第4図はgalT、galK遺伝子をコリネバクテリウム・アノモニアゲナス

で発現するプラスミドpTK7の造成工程を示す。

第5図はgalM、ppa遺伝子発現プラスミドpNT14の造成工程を示す。
第6図はpgm遺伝子発現プラスミドpNT24の造成工程を示す。

第7図はglmM遺伝子発現プラスミドpNT44の造成工程を示す。
第8図はglk遺伝子発現プラスミドpNT46の造成工程を示す。

第9図はpfkB遺伝子発現プラスミドpNT47の造成工程を示す。
第10図はgalK遺伝子発現プラスミドpNT54の造成工程を示す。

第11図はmanB、manC遺伝子発現プラスミドpNK7の造成工程を示す。
第12図はpgm、pfkB遺伝子発現プラスミドpNT55の造成工程を示す。

第13図はgmd、wcaG遺伝子発現プラスミドpNK8の造成工程を示す。
第14図はneuA遺伝子発現プラスミドpTA14の造成工程を示す。

第15図はlgc遺伝子発現プラスミドpGT3の造成工程を示す。

第16図はlgcB遺伝子発現プラスミドpNT60の造成工程を示す。

第1-(1)表および第1-(2)表に本発明に用いる略号および該略号の説明を記す。

第 1-(1) 表

Glc	グルコース
G-6-P	グルコース-6-リン酸
G-1-P	グルコース-1-リン酸
Glc-1, 6-P ₂	グルコース-1, 6-二リン酸
Ga1	ガラクトース
Ga1-1-P	ガラクトース-1-リン酸
GlcN-6-P	グルコサミン-6-リン酸
GlcN-1-P	グルコサミン-1-リン酸
GlcUA	グルクロン酸
GlcN	グルコサミン
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン
GlcNAc-1-P	N-アセチルグルコサミン-1-リン酸
F-6-P	フルクトース-6-リン酸
F-1, 6-P ₂	フルクトース-1, 6-二リン酸
Man	マンノース
Man-6-P	マンノース-6-リン酸
Man-1-P	マンノース-1-リン酸
GDP-4-keto-6-deoxyMan	4-ケト-6-デオキシマンノース
ManNAc	N-アセチルマンノサミン
NeuAc	N-アセチルノイラミン酸
アセチルCoA	アセチルコエニザイムA
NTF	ヌクレオチド-5'-三リン酸
NDP	ヌクレオチド-5'-二リン酸
NMP	ヌクレオチド-5'-一リン酸
ATP	アデノシン-5'-三リン酸
UTP	ウリジン-5'-三リン酸
GTP	グアノシン-5'-三リン酸
CTP	シチジン-5'-三リン酸
GMP	グアノシン-5'-一リン酸

第 1 - (2) 表

UDP-Glc	ウリジク-5'- β - <small>二リク酸</small> グルコース
UDP-Gal	ウリジク-5'- β - <small>二リク酸</small> ガラクトース
UDP-GlcNAc	ウリジク-5'- β - <small>二リク酸</small> N-アセチル グルコサミン
UDP-GalNAc	ウリジク-5'- β - <small>二リク酸</small> N-アセチル ガラクトサミン
UDP-GlcUA	ウリジク-5'- β - <small>二リク酸</small> グルクロン酸
GDP-Man	グアノシク-5'- β - <small>二リク酸</small> マンノース
GDP-Fuc	グアノシク-5'- β - <small>二リク酸</small> フコース
CMP-NeuAc	シチジク-5'- β - <small>二リク酸</small> N-アセチル ノイラミン酸
GaiU	グルコース-1-リク酸ウリシルトリン スフエラセ
pa	(イノ-カンク)ピロホスファターゼ
galK	ガラクトキナーゼ
galT	ガラクト-1-リク酸ウリシルトリン スフエラセ
galMU	N-アセチルノイラミン酸ウリシルトリン グルコサミン-1-リク酸スフエラセ
pgm	ホスホグルコムターゼ
pfkB	ホスホフルクトキナーゼ
glmM	ホスホグルコサミンムターゼ
glk	グルコキナーゼ
manB	ホスホマンノムターゼ
manC	マンノース-1-リク酸ウリシルトリン スフエラセ
gmd	GDP-マンノース-4,6-アセチルターゼ
wcag	GDP-4-クト-6-アキシマンノースエヒ スラセ・シタターゼ
neuA	CMP-N-アセチルノイラミン酸シタ ターゼ
neuB	N-アセチルノイラミン酸シタターゼ
nanA	N-アセチルノイラミン酸フルトラーゼ
pyrG	シチジク-5'- β - <small>二リク酸</small> ピリミジン酸 シタターゼ
lgtB	β -1,4-ガラクトシルトリンスフエラセ
lgtC	α -1,4-ガラクトシルトリンスフエラセ
ugd	UDP-グルコースヒドロクサセ

本発明によれば、1) NTPや糖リッ酸等の高価な原料を必要とせず、オロツト酸等の安価なヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料とする、2) NMPあるいはNDPからNTPへの転換において高価なホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼの添加を必要としない、さらに、3) 酵素の単離操作を必要としない等の特徴を有する糖ヌクレオチドの新規な製造法および該糖ヌクレオチド製造法を利用した新規な複合糖質の製造法を提供できる。

本発明の製造法で製造される糖ヌクレオチドとしては、ヌクレオシド-5'-二リン酸残基の末端リン酸残基と糖残基の還元基とがエステル結合をした一般構造を有する化合物をあげることができ、更に、ヌクレチド残基がシチジン-5'-一リン酸のもの、糖残基がポリオールのもも本発明により製造される糖ヌクレオチドに含まれる。

本発明の製造法で製造される複合糖質としては、単糖、オリゴサッカライド、担体等に結合した単糖またはオリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、グリコパプチドあるいはヌクレオチド化合物等に糖質が結合した化合物をあげることができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

1) 本発明で用いられるヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物としては、ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物であればいずれも用いることができ、例えば、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物等をあげることができる。

エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができ、

コリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム・アノモニアゲナス等をあげることができる。

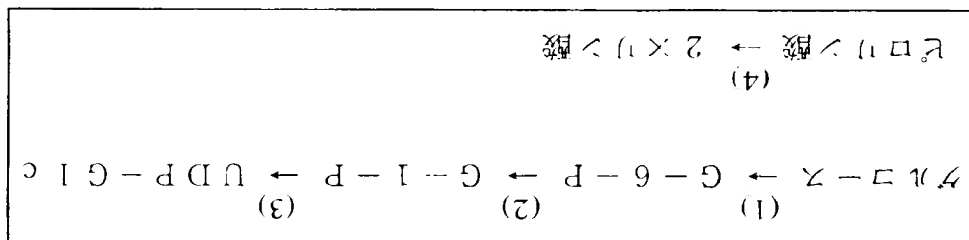
2) 本発明で用いられる糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物としては、目的とする糖ヌクレオチドを生成する活性を有する生物であればいずれも用いることができ、例えば、

2) -① U D P - G 1 c の生産に関しては、下記、式 1 に示した (1) から

(4) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシエリヒア属に属する微生物およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アシモニアケナスをあげることができる。

また、(1)、(2)、(3) および (4) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来の g a 1 U および p p a 遺伝子を含む組換え体 DNA (p N T 1 2) を保有するエシエリヒア・コリ KY8415 (FERM BP-408) 株等をあげることができる。



(式 1)

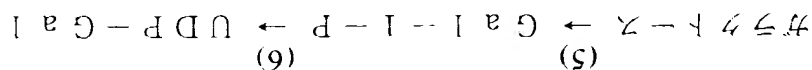
(1): ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1) あるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)
 (2): ホスホグルコムターゼ (EC 2.7.5.1)
 (3): グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.9)
 (4): (イノーガニク) ピロホスワターゼ (EC 3.6.1.1)

2) -② U D P - G a 1 の生産に関しては、下記、式 2 に示した (5) および (6) の酵素活性の強い微生物を、また、好ましくは、式 1 に示した (1) から (4) の酵素活性の強い性質をもあわせ持つような微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシエリヒア属に属する微生物およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アシモニアケナスをあげることができる。

また、(5) および (6) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を、あるいは、

(5) および (6) から選ばれる一つ以上の酵素と (1) から (4) から選ばれ
 る一つ以上の酵素の活性を、遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用い
 ることもできる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来の g a
 1 T および g a 1 K 遺伝子を含む組換え体 DNA (p N T 2 5) を保有するエシ
 エリヒア・コリ NM522 株およびエシエリヒア・コリ由来の g a 1 T および g a 1
 K 遺伝子を含む組換え体 DNA (p T K 7) を保有するコリネバクテリウム・フ
 シモニアケナス ATCC21170 をあげることができる。



(5): ガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6)
 (6): ガラクトース-1-リジ酸ウリシルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.12)

2) -③ UDP - G 1 c N A c の生産に関しては、下記、式 3 に示した (7)
 から (12) および式 1 に示した (4) の酵素活性の強い微生物、あるいは式 3
 に示した (13) および (10) の酵素活性の強い微生物を用いることが好まし
 い。

具体的には、エシエリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあ
 げることができる、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリおよびコリネバ
 クテリウム・フシモニアケナスをあげることができる。

また、(4)、(7)、(8)、(9)、(10)、および(13)から選ば
 れる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用い
 ることもできる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来の g 1
 m 遺伝子を含む組換え体 DNA (p N T 4 4) を保有するエシエリヒア・コリ
 NM522 株、エシエリヒア・コリ由来の g 1 m じおよび p a 遺伝子を含む組換え
 体 DNA (p N T 1 4) を保有するエシエリヒア・コリ KY8415 株、エシエリヒ
 ア・コリ由来の g 1 k 遺伝子を含む組換え体 DNA (p N T 4 6) を保有するエ
 シエリヒア・コリ NM522 株、エシエリヒア・コリ由来の g a 1 K 遺伝子を含む組

換え体DNA (pNT54) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげる
ことができる。

遺伝子組換えによる (8) のホスホグルコサミントクサーゼ活性の発現および増
強には、G1c-1, 6-P2 の添加が必要とされるが [J. Biol. Chem., 271,
32 (1996)], (11) および (12) の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増
強した形質転換株を用いることにより、G1c-1, 6-P2 を添加することな
く、G-6-P および F-6-P から G1c-1, 6-P2 を供給することが可
能である。

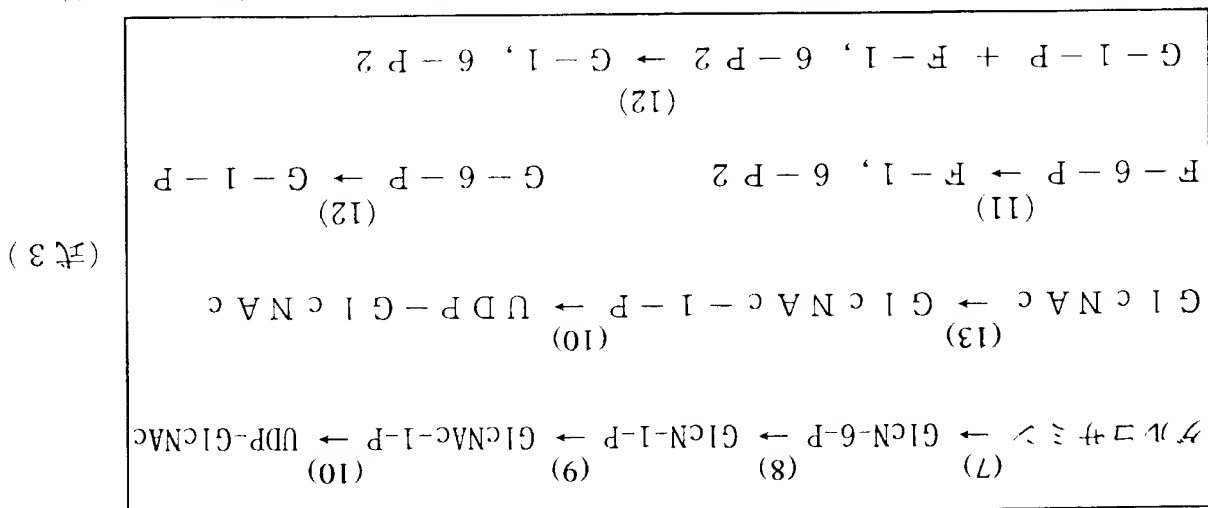
このような形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の pgm 遺伝
子を含む組換え体DNA (pNT24) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、
エシェリヒア・コリ由来の pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT47)
を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の pgm およ
び pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT55) を保有するエシェリヒ
ア・コリ NM522 株等をあげることができる。

(11) および (12) の酵素活性を用いて G-6-P および F-6-P から
G1c-1, 6-P2 を供給することにより、(8) のホスホグルコサミントク
サーゼ活性の発現を増強する方法は本発明で初めて開示された方法である。

(13) のガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6) を用い G1cNAc から G1cNA
c-1-P を製造する方法は本発明で初めて開示された製造法である。該製造法
を用いて G1cNAc-1-P を製造することが可能である。即ち、ガラクトキ
ナーゼ活性の強い微生物、例えば、galK をコードする遺伝子を含む DNA 断
片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物の培養液または該培養液の処
理物を酵素源として用い、該酵素源および G1cNAc を水性媒体中に存在せし
め、該水性媒体中に G1cNAc-1-P を生成蓄積させ、該水性媒体中から G
1cNAc-1-P を採取することにより G1cNAc-1-P を製造すること
ができる。

水性媒体より、G1cNAc-1-P の採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を

用いる通常の方法によって行うことができる。



(7): ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1)あるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)

(8): ホスホグルコサミンスムターゼ

(9): グルコサミン-1-リソ酸アセチルトランスフェラーゼ

(10): N-アセチルグルコサミン-1-リソ酸ウリシルトランスフェラーゼ

(EC 2.7.7.23)

(11): ホスホフルクトキナーゼ (EC 2.7.1.11)

(12): ホスホフルクトターゼ (EC 2.7.5.1)

(13): ガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6)

2) -④ UDP-Ga1NAcの生産に関しては、式3に示した(7)から

(12)、式4に示した(14)および式1に示した(4)の酵素活性の強い微生物、あるいは式3に示した(10)、(13)および式4に示した(14)の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシエリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあ

げることができる、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アモニアクネスをあげることができる。

また、(7)から(14)および(4)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。

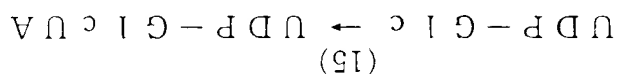
換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来のmanBおよびmanC遺伝子を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来のmanBおよびmanC遺伝子を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。また、(16)、(17)および(18)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を増強することができる。

具体的には、エシエリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物を用いることができる。好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アノモニアケネスをあげることができる。

(18) および式3に示した(11)および(12)の酵素活性の強い微生物を用いることができる。

(15): UDP-GlcNAc 4-エピメラーゼ (EC 1.1.1.22)

(式5)

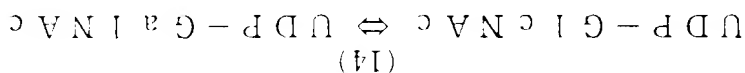


具体的には、エシエリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物を用いることができる。好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アノモニアケネスをあげることができる。また、(1)、(2)、(3)、(4)および(15)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を増強した形質転換株を用いることもできる。

(14) および式5に示した(15)の酵素活性の強い微生物を用いることができる。

(14): UDP-GlcNAc 4-エピメラーゼ (EC 5.1.3.7)

(式4)

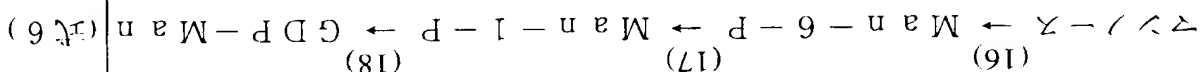


を含む組換え体DNA (pNK7) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株、エシエリヒア・コリ由来の g1k 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT46) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株等を用いることができる。

遺伝子組換え技術による (17) のホスホマンノムターゼ活性の発現および増強には、G1c-1, 6-P2 の添加が必要とされるが、(11) および (1

2) の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることから G1c-1, 6-P2 を供給することが可能である。このような形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来の p g m 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT24) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株、エシエリヒア・コリ由来の p f k B 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT47) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株、エシエリヒア・コリ由来の p g m および p f k B 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT55) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株等を用いることができる。

(11) および (12) の酵素活性を用いて G-6-P および F-6-P から G1c-1, 6-P2 を供給することにより、(17) のホスホマンノムターゼ活性の発現を増強する方法は本発明で初めて開示された方法である。



(16): ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1) あるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)
(17): ホスホマンノムターゼ (EC 2.7.5.7)
(18): マンノース-1-リソ酸グアニルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.13)

2) -⑦ GDP-Fuc の生産に関しては、下記、式7に示した (19) および (20) および式6に示した (16) から (18) および式3に示した (11) および (12) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

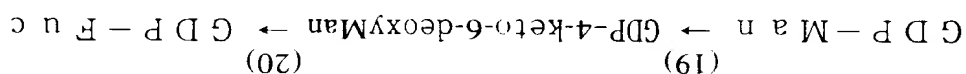
具体的には、エシエリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあ

げることができる、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリまたはコリネバ
クテリウム・フシモニアゲネスをあげることができる。

また、(16)、(17)、(18)、(19)および(20)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いるこ
ともできる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来のmanB
およびmanC遺伝子を含む組換え体DNA(pNK7)を保有するエシエリヒ
ア・コリNM522株、エシエリヒア・コリ由来のgmdおよびwcaG遺伝子を含
む組換え体DNA(pNK8)を保有するエシエリヒア・コリNM522株、エシエ
リヒア・コリ由来のglk遺伝子を含む組換え体DNA(pNT46)を保有す
るエシエリヒア・コリNM522株等をあげることができる。

遺伝子組換え技術による(17)のホスホフスノムターゼ活性の発現および増
強には、Glc-1, 6-P2の添加が必要とされるが、(11)および(1
2)の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることに
より、Glc-1, 6-P2を添加することなく、G-6-PおよびF-6-P
からGlc-1, 6-P2を供給することが可能である。

このような形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来のpgm遺伝
子を含む組換え体DNA(pNT24)を保有するエシエリヒア・コリNM522株、
エシエリヒア・コリ由来のpfkB遺伝子を含む組換え体DNA(pNT47)
を保有するエシエリヒア・コリNM522株、エシエリヒア・コリ由来のpgmおよ
びpfkB遺伝子を含む組換え体DNA(pNT55)を保有するエシエリヒ
ア・コリNM522株等をあげることができる。



(式7)

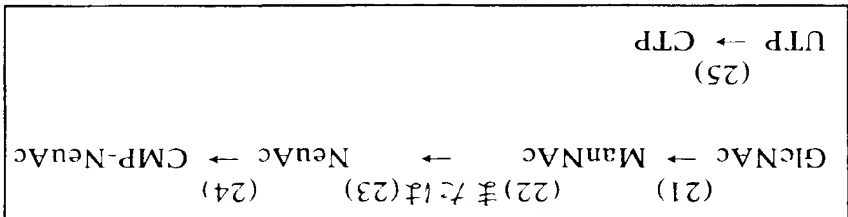
(19): GDP-Man-4,6-フヒフラターゼ(EC4.2.1.47)

(20): GDP-4-keto-6-deoxymannose エドムラーゼ/フラクターゼ

2) - ⑧ CMP-NeuAc の生産に関しては、下記、式 8 に示した (21)、(22) または (23)、(24) および (25) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシエリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができる、好ましい具体例としては、エシエリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アジゲナスをあげることができる。

また、(21)、(22)、(23)、(24) および (25) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることができる。該形質転換体の具体例として、エシエリヒア・コリ由来の nana 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNAL1) を保有するエシエリヒア・コリ C600 株 [Appl. Environ. Microbiol., 51, 562 (1986)]、エシエリヒア・コリ由来の neuA 遺伝子を含む組換え体 DNA (pTA14) を保有するエシエリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。



(21):GlcNAc 2-エドメラーゼ (EC 5.1.3.8)
 (22):NeuAc アルドラーゼ (EC 4.1.3.3)
 (23):NeuAc シンセターゼ (EC 4.1.3.19)
 (24):CMP-NeuAc シンセターゼ (EC 2.7.7.43)
 (25):CTP シンセターゼ (EC 6.3.4.2)

微生物が (1) に記載の微生物の性質および (2) に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、ヌクレオチドの前駆物質と糖より糖ヌクレオチドを生産することが可能である。

微生物が (1) に記載の微生物の性質および (2) - ① に記載の性質を同時に有す

る場合には、該微生物を利用し、オロト酸等のUTP前駆物質とグルコースよりUDP-Glcを、1)に記載の微生物の性質および2) - ③に記載の微生物の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロト酸等のUTP前駆物質とガラクトースよりUDP-Galを、1)に記載の微生物の性質および2) - ③に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロト酸等のUTP前駆物質とガラクトースよりUDP-Glcを、1)に記載の性質および2) - ④に記載の性質を同時に有する場合には該微生物を利用し、オロト酸等のUTP前駆物質とグルコースよりUDP-Glcを、1)に記載の性質および2) - ⑤に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、GMP等のGTP前駆物質とマシノースよりGDP-Manを、1)に記載の微生物の性質および2) - ⑦に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、GMP等のGTP前駆物質とマシノースよりGDP-Fucを、1)に記載の微生物の性質および2) - ⑧に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロト酸等のCTP前駆物質とN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルマシノースよりCMP-NeuAcを生産することが可能である。

このような微生物の具体例としては、エシェリヒア・コリ由来のgalTおよびgalK遺伝子を発現するコリネバクテリウム・フシモニアケナスをあげることができる。また、上記の菌株とは異なり、1菌株中に糖ヌクレオチドの製造に必要な活性の一部しか有していない微生物の場合、それぞれの活性を有する微生物を適宜組み合わせ、糖ヌクレオチドの製造を行うことができる。

1)に記載の性質を有する微生物も1種類である必要はなく、2種類以上で1)に記載する性質を構成する場合にも1)に記載の性質を有する微生物として

例示することができる (特開平3-27034)。

同様に2)に記載の性質を有する微生物も1種類である必要はなく、2種類以上で構成することができる。該微生物群を適宜組み合わせることにより、目的と

る一種類以上の微生物を用い、(1)に記載の性質を有する微生物および、 UDP-Glc を、(1)に記載の性質を有する微生物および(2)に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロト酸等のUTP前駆物質とガラクトースとの転移反応により、(1)に記載の性質を有する微生物および(2) — ③

質とグルコサミン^①またはN-アセチルグルコサミン^②を有する一種類以上の微生物を用い、オロト酸等のUTP前駆物質とグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン^③を、1)に記載の性質を有する微生物

酸等のUTP前駆物質と、(7)に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用
質を有する微生物および(2)～(6)に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用
い、GMP等のGTP前駆物質と、(7)に記載の性質を有する一種類以上の微生物

記載の性質を有する微生物および、
生物を用い、オロツト酸等のCTP前駆物質とN-アセチルグルコサミンまたは
N-アセチルマンノサミンよりCMP-NeuAcを生産することが可能である
遺伝子組換え微生物を利用す

-17-

リヒア・コリの染色体よりクロン化され、その塩基配列が決定されている。

第 2 表

遺伝子	参考文献
g a l U 遺伝子	J. Biochem., 115, 965 (1994)
p a 遺伝子	J. Bacteriol., 170, 5901 (1988)
g a l K 遺伝子	Nucleic Acids Res., 13, 1841 (1985)
g a l T 遺伝子	Nucleic Acids Res., 14, 7705 (1986)
g l m U 遺伝子	J. Bacteriol., 175, 6150 (1993)
p g m 遺伝子	J. Bacteriol., 176, 5847 (1994)
p f k B 遺伝子	Gene, 28, 337 (1984)
g l m M 遺伝子	J. Biol. Chem., 271, 32 (1996)
g l k 遺伝子	J. Bacteriol., 179, 1298 (1997)
m a n B 遺伝子	J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)
m a n C 遺伝子	J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)
g m d 遺伝子	J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)
w c a G 遺伝子	J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)
n e u A 遺伝子	J. Biol. Chem., 264, 14769 (1989)
n e u B 遺伝子	J. Bacteriol., 177, 312 (1995)
n a n A 遺伝子	Nucleic Acids Res., 13, 8843 (1985)
p y r G 遺伝子	J. Biol. Chem., 261, 5368 (1986)
u g d 遺伝子	J. Bacteriol., 177, 4562 (1995)

該遺伝子を含むプラスミドを保有するエシェリヒア・コリからのプラスミド DNA の単離精製、プラスミド DNA の制限酵素による切断、切断した DNA 断片の単離精製、DNA 断片の酵素的結合、組換え体 DNA を用いたエシェリヒア・コリの形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法 [例えば J. Sambrook らの成書; Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second edition Cold Spring Harbor Laboratory (1989)] に準じて行うことができる。またポリメラーゼ・チェイン・リアクション (以下、PCR と略す) はバキレン・エルマー・シータス社製のサーマル・サイクラー等を用いて行うことができる。

糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を宿主中で発現させるためには、該遺

伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主中に導入することにより達成できる。

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ゾレバクテリウム属、シユードモナス属、バチルス属、等に属する微生物の他、サッカロマイセス属、キヤンディダ属等に属する酵母等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主に於いて自立複製可能ないは染色体中への組込みが可能で、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

上記の微生物を宿主として用いる場合は、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子の発現ベクターは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子、転写終結配列より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベリシガーメンハイム社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK+ (STRATAGENE社製)、pTrs30 [エシェリヒア・コリJM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製] およびpTrs32 [エシェリヒア・コリJM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798)、pCG11 (特公平6-91827) 等を例示することができる。

プロモーターとしては、上記の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター

リボソーム結合配列としては、上記の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、リボソーム結合配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

XL1-Blue, Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli DH1, Escherichia coli MC1000, Escherichia coli KY3276, Escherichia coli W1485, Escherichia coli JM109, Escherichia coli HB101, Escherichia coli No. 49, Escherichia coli W3110, Escherichia coli NY49, Escherichia coli KY8415, Escherichia coli NM522, Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Bacillus amyloliquefacines, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Brevibacterium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170, Corynebacterium glutamicum ATCC13032,

プロモータ一としては、酵母菌株の宿主中で発現できるものであるかなる

ものでもよい。例えば、ヘキソキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、レポートシヨック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主としては、組換え体DNAが発現でき、糖ヌクレオチドの生成反応に利用できるものならいかなる酵母も使用でき、具体的には、*Saccharomyces*

cerevisiae、*Candida utilis*、*Candida parapsilosis*、*Candida krusei*、*Candida versatilis*、*Candida lipolytica*、*Candida zeylanoides*、*Candida guilliermondii*、*Candida albicans*、*Candida humicola*、*Pichia farinosa*、*Pichia ohmeri*、*Torulopsis candida*、*Torulopsis spharica*、*Torulopsis*

xylinus、*Torulopsis famata*、*Torulopsis versatilis*、*Debaryomyces subglobosus*、*Debaryomyces cantarellii*、*Debaryomyces globosus*、

Debaryomyces hansenii、*Debaryomyces japonicus*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Zygosaccharomyces baillii*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Hansenula anomala*、*Hansenula jadinii*、*Brettanomyces lambicus*、

Brettanomyces anomalus、*Schizosaccharomyces pombe*、*Trichosporon pullulans* および *Schwanniomyces alivius* 等をあげることができる。

本発明に用いる微生物の培養は、通常の培養方法に従って行うことができる。該微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコー

ス、フルクトース、シユークロース、ラクトース、マルトース、マシニトール、ソルビトール、糖蜜、澱粉あるいは澱粉加水分解物等の炭水化物、ピルピソ酸、乳酸、クエソ酸、フマル酸等の各種有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジン等の各種アミノ酸、エタノール、プロパノール、グリセロール等のアルコール類が用いられる。また、白糖、キヤッサバ、バガス、コーン・ステアーザ・リカー

等の天然有機栄養源も用いることができる。

窒素源としては、アミノ酸、塩化アミノ酸、硫酸アミノ酸、炭酸アミノ酸、酢酸アミノ酸、リジン酸アミノ酸等の各種無機および有機アミノ酸、グルタミン酸、グルタミン酸、メチオニン等のアミノ酸、ペプトン、NZアミン、コエンザイム・B₁₂、リカー、肉エキスを、酵母エキスを、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、アミノ酸等あるいはその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硫酸銅、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等が用いられる。ビタミン、アミノ酸、核酸等が必要に応じて添加してもよい。

培養は、振盪培養または通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15〜45℃がよい。培養時間は、通常5〜96時間である。培養中pHは、3.0〜9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アミノ酸等を用いて行う。また培養中に必要に応じてアミノ酸、ビタミン、カゼインまたはクロラムフェニコール等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合には、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

本発明の糖ヌクレオチドの製造において、2種以上の微生物を用いる場合、該微生物それぞれを個別に培養し、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよいし、一つの培養器に同時に植菌し、混合培養した後、該培養液を利用

して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。また、いずれかの微生物の培養中もしくは培養終了時に残りの微生物を植菌し、培養した後、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。更に、上述 1) に記載の性質を有する微生物ヌクレオチドの製造に用いてもよい。また、上述 2) に記載の性質を有する微生物と 2) に記載の性質を有する微生物とを別々に培養し、各々の培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。

該培養により得られた微生物の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で糖ヌクレオチドの生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分離物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げるることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる酵素源の量は、湿菌体として、1～500 g/l であり、好ましくは 5～300 g/l である。また、同時に 2 種以上の微生物を用いて水性媒体中で反応を行う場合には、水性媒体中の該微生物の全湿菌体量は 2～500 g/l であり、好ましくは 5～400 g/l である。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトンのケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられるヌクレオチドの前駆物質としては、オロト酸、ウラシル、オロチジン、ウリジン、シトシン、シチジン、アデニン、アデノシン、グアニン、グアノジン、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン、

キサントキシ、イノキシ-5'、---リノ酸、キサントキシ-5'、---リノ酸、グ
7ノキシ-5'、---リノ酸、カリキシ-5'、---リノ酸およびシチキシ-5'、---
7ノキシ-5'、---リノ酸、カリキシ-5'、---リノ酸およびグアノキシ-5'、---
---リノ酸等をあげることができる。好ましくはオロツト酸およびグアノキシ-5'、---
---リノ酸をあげることができる。該ヌクレオチドの前駆物質は、純品および該

前駆物質の塩並びに夾雑物が反応を阻害しない限り、微生物により発酵生産され
た該前駆物質含有培養液および該培養液の該前駆物質粗精製物を用いることがで

0.3 M の濃度で用いられる。

0.3 M の濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる糖としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、フコース、N-アセチルマンノサミン、アセチルノイラミン酸およびこれらの誘導体等をあげることができる。該糖は、純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればよい。

2. 0 Mの濃度で用いられる。

2. 0 M の濃度で用いられる。
糖ヌクレオチドの生成において、必要に応じて、ATP 再生に必要なエネルギー一供与体、補酵素、リノ酸イオン、マグネシウムイオン、フイチン酸等のキレ-

下剤、界面活性剤および有機溶剤と混和する。エネルギー供与体としては、グルコース、フルクトース、シユークロース、ラクトース、アルトース、マニトール、ソルビトール等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸等の有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸、糖蜜、澱粉加水分解物等をあげることができる。1. 0 mM ~ 2. 0

Mの濃度で用いられる。

リン酸イオンとしては、正リン酸、ピロリン酸、トリホリリン酸、チトラホリリン酸、ポリリン酸、メタリン酸、トリメタリン酸、リン酸一カリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸等の無機リン酸塩等を

あげることができる。1. 0 mM ~ 1. 0 M の濃度で用いることができる。

マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等の無機マグネシウム塩、クエン酸マグネシウム等の有機マグネシウム塩等をあげることができる。通常 1 ~ 100 mM の濃度で用いられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン等の非イオン系界面活性剤（例えばナイミン S-215、日本油脂社製）、セチルトリメチルアゾモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアゾモニウムクロライド等のカチオン系界面活性剤（例えばカチオン F2-40E、日本油脂社製）、ラウロイル・サルコシネート等のアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン等の三級アミン類（例えば三級アミン FB、日本油脂社製）等、各種糖ヌクレオチドの生成を促進するものであればいずれでも良く、1 種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 0. 1 ~ 50 g/l の濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチル等が挙げられ、通常 0. 1 ~ 50 ml/l の濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成反応は、水性媒体中、pH 5 ~ 10、好ましくは pH 6 ~ 9、20 ~ 50℃ の条件で 2 ~ 96 時間行う。

該方法により糖ヌクレオチドを生成することができる。例えば、ウリジニリン酸化合物、グアノシニリン酸化合物およびシチジニリン酸化合物等をあげることができる。具体的には、UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-GalNAc、UDP-GalNAc、UDP-GlcUA、GDP-Mann、GDP-Man、CMP-Nuc およびこれらの誘導体から選ばれる糖ヌクレオチド等をあげることができる。

水性媒体中に生成した糖ヌクレオチドの定量は公知の方法に準じて行うことができる。例えば、UDP-Glc と UDP-Gal の分離定量は Anal. Biochem., 216, 188 (1994) 記載の高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC と略す）による方法で行うことができる。また、UDP-GlcNAc、GDP-Mann、GDP-Fuc、CMP-Nuc の分離定量は以下の条件の HPLC により

行うことができる。

溶出液：0.1M KH_2PO_4 (H_2PO_4^- を用いてpH3.2に調整)

流速：1ml/min

カラム：Partisil-10 SAX (ワットマン社製)

検出：UV262nm

定量：スクラードの吸光度値の比較により算出

反応液中に生成した糖スクラードの採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、UDP-GalおよびUDP-GlcにおいてはJ. Org. Chem., 57, 152 (1992)、UDP-GlcNAcにおいてはJ. Org. Chem., 57, 146 (1992)に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明の複合糖質の製造に用いることができる微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞としては、糖スクラードと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞であればいずれも用いることができる。例えば、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ等の活性を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞をあげることができる。

また、前述の糖スクラードの製造の場合と同様に、遺伝子組換え技術により造成された微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞を利用することもできる。例えば、ヒト・マラノーア細胞SK-Mel-28細胞由来のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシエリヒア・コリ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 4638 (1996)]、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを生産するヒト・マラノーア細胞WM266-4株 (ATCC CRL1676)、およびヒト・マラノーア細胞

- 胞 WM266-4 由来 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有するナール
バ細胞 KJM-1 株等の組換え株 (特開平 6-181759)、ヒト H e l a 細胞由来の β
1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシエリヒマコリ
[EMBO J., 9, 3171 (1990)] あるいは *Saccharomyces cerevisiae* [Biochem.
Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、ラット由来の β 1,6-N-アセチルガ
ルコサミンシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する COS-7 細胞 (ATCC
CRL1651) [J. Biol. Chem., 268, 15381 (1993)]、ヒト由来の N-アセチルガラ
クトサミンシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する Sf 9 細胞 [J. Biochem.,
118, 568 (1995)]、ヒト由来のグルクロノシルトランスフェラーゼを発現する
エシエリヒマコリ [Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 473 (1993)]、
ヒト由来の α 1,3-7 コシルトランスフェラーゼを発現する ナールバ細胞 [J.
Biol. Chem., 269, 14730 (1994)]、ヒト由来の α 1,3/1,4-7 コシルトランスフ
エラーゼを発現する COS-1 細胞 [Genes Dev., 4, 1288 (1990)]、ヒト由来
の α 1,2-7 コシルトランスフェラーゼを発現する COS-1 細胞 [Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 87, 6674 (1990)]、チキン由来の α 2,6-シアルシルトランスフ
エラーゼを発現する COS-7 細胞 [Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)]、
ヒト由来の α 2,8-シアルシルトランスフェラーゼを発現する CHO 細胞 [Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7952 (1994)]、ナイセリヒマコリ由来の β 1,3-N-アセチ
ルグルコサミンシルトランスフェラーゼあるいは β 1,4-ガラクトシルトランスフ
エラーゼあるいは β 1,3-N-アセチルガラクトサミンシルトランスフェラーゼあるいは
 α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼを発現するエシエリヒマコリ
(W096/10086)、ナイセリヒマコリ由来の α 2,3-シアルシルトランスフェラーゼを発現する
(W096/10086)、ナイセリヒマコリ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)]、ヘリコバクタ
エシエリヒマコリ由来の α 1,3-7 コシルトランスフェラーゼを発現するエシエリヒマ
コリ [J. Biol. Chem., 272, 21349 および 21357 (1997)]、酵母由来の α 1,2-
マノシルトランスフェラーゼを発現するエシエリヒマコリ [J. Org. Chem.,
58, 3985 (1993)] 等の微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞をあげること

ができる。

本発明の複合糖質の製造に微生物を用いる場合には、該微生物を、上記ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養と同様の培地、培養条件により培養することができる。

本発明の複合糖質の製造に動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を培養する培地として、一般に使用されている RPMI 1640 培地、Eagle の MEM 培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、5% CO₂ 存在下等の条件下で行う。培養温度は 20～40℃がよく、培養時間は、通常 3～14 日間である。また必要に応じて、抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の複合糖質の製造に昆虫細胞を用いる場合には、該昆虫細胞の培養を公知の方法 [J. Biol. Chem., 268, 12609 (1993)] に準じて行うことができる。

該培養により得られた微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で複合糖質の生成に用いることができる。培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

複合糖質の生成において用いられる酵素源の量は、酵素の活性を、37℃で 1 分間に 1 μmole の複合糖質を生成することのできる活性を 1 単位 (U) として、0.1 mU/1～1000 U/1 であり、好ましくは 1 mU/1～1000 U/1 の濃度で用いることができる。

複合糖質の生成において用いられる水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等

(1) ナイセリブ由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、U T Pの前駆物質からU T Pを生産する能力を有する微生物、糖とU T PからU D P-G a lを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースとグルコースからラクトースを生成させることができる。

(2) ナイセリウム山のβ₁,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTPの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物、糖とUTPからUDP-Galを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースとN-アセチルグルコサミンからN-アセチラクトサミンを生成させることができる。

(3) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、C T P の前駆物質から C T P を生産する能力を有する微生物、糖と C T P から C M P - N e u A c を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロット酸と N - アセチルマンサミンとピルビン酸とラクトースから 3'-シアリルトランスを生成させることができる。

(4) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、C T P の前駆物質から C T P を生産する能力を有する微生物、糖と C T P から C M P - N e u A c を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロット酸と N - アセチルマンサミンとピルビン酸と N - アセチルラクトサミンから 3'-シアリル - N - アセチルラクトサミンを生成させることができる。

(5) チキン由来の α 2,6-シアリルトランスフェラーゼを発現する C O S - 7 細胞 [Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)]、C T P の前駆物質から C T P を生産する能力を有する微生物、糖と C T P から C M P - N e u A c を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロット酸と N - アセチルマンサミンとピルビン酸と N - アセチルラクトサミンから 6'-シアリル - N - アセチルラクトサミンを生成させることができる。

(6) ナイセリア由来の β 1,3-N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、U T P の前駆物質から U T P を生産する能力を有する微生物、糖と U T P から U D P - G l c N A c を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロット酸と N - アセチルグルコサミンとラクトースから G l c N A c β 1-3 G a l β 1-4 G l c を生成させることができる。

(7) β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを産生するヒト・マラノーマ細胞

WM266-4株 (ATCC CRL1676)、あるいはヒト・メラノーマ細胞 WM266-4由来 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するサマルパ細胞 KJM-1株等の組換え株 (特開平6-181759)、U TPの前駆物質からU TPを生産する能力を有する微生物、糖とU TPからUDP-GaIを生産する能力を有する微生物または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロツト酸とガラクトースとGlcNAc β 1-3GaI β 1-4Glcからラクト-N-チトラオースを生成させることができる。

(8) ヒトHeLa細胞由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシェリヒヤ・コリ [EMBO J., 9, 3171 (1990)]あるいはSaccharomyces cerevisiae [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、U TPの前駆物質からU TPを生産する能力を有する微生物、糖とU TPからUDP-GaIを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロツト酸とガラクトースとGlcNAc β 1-3GaI β 1-4Glcからラクト-N-チトラオースを生成させることができる。

(9) ナイセリヤ由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086)を発現する微生物、U TPの前駆物質からU TPを生産する能力を有する微生物、糖とU TPからUDP-GaIを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロツト酸とガラクトースとGlcNAc β 1-3GaI β 1-4Glcからラクト-N-チトラオースを生成させることができる。

(10) ナイセリヤ由来の β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (W096/10086)を発現する微生物、ナイセリヤ由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086)を発現する微生物、U TPの前駆物質からU TPを生産する能力を有する微生物、糖とU TPからUDP-GaIを生産する能力を有する微生物、糖とU TPからUDP-GaIを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことに

より、オロト酸とN-アセチルグルコサミンとガラクトースとラクトースからラクト-N-ネオテトラオースを生成させることができる。

(11) ナイセリド由来の α 2,3-シアリルトランスフエラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、C T Pの前駆物質からC T Pを生産する能力を有する微生物、糖とC T PからCMP-N e u A cを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことができる。オロト酸とN-アセチルグルコサミンとピルビン酸とラクト-N-ネオテトラオースから(2, 3) シアリルラクト-N-ネオテトラオースを生産させることができる。

(12) ヒト由来の α 1,3-フコシルトランスフエラーゼを発現するサマルパ細胞 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)]、G T Pの前駆物質からG T Pを生産する能力を有する微生物、糖とG T PからG D P-F u cを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、G M Pとマンノースとラクト-N-ネオテトラオースからラクト-N-フコペンタオースIIIを生成させることができる。

(13) ヘリコバクター・ピロリ由来の α 1,3-フコシルトランスフエラーゼ [J. Biol. Chem., 272, 21349 および 21357 (1997)] を発現する微生物、G T Pの前駆物質からG T Pを生産する能力を有する微生物、糖とG T PからG D P-F u cを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、G M Pとマンノースとラクト-N-ネオテトラオースからラクト-N-フコペンタオースIIIを生成させることができる。

(14) ナイセリド由来の α 1,4-ガラクトシルトランスフエラーゼ

(W096/10086) を発現する微生物、U T Pの前駆物質からU T Pを生産する能力を有する微生物、糖とU T PからU D P-G a lを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースとラクトースからグロボトリオースを生成させることができる。

(15) ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、ナイセリア由来の α 1,4-ガラクトクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、U T P の前駆物質から U T P を生産する能力を有する微生物、糖と U T P から U D P - G a l を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースとグルコースからクロボトリオースを生成させることができる。

(16) ナイセリア由来の α 1,4-ガラクトクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、U T P の前駆物質から U T P を生産する能力を有する微生物、糖と U T P から U D P - G a l を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースと N - アセチルラクトサミンから G a l α 1-4 G a l β 1-4 G l c N A c を生成させることができる。

(17) ヒト由来の β 1,3-ガラクトクトシルトランスフェラーゼ (特開平 6-181759) を発現する動物細胞、U T P の前駆物質から U T P を生産する能力を有する微生物、糖と U T P から U D P - G a l を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロト酸とガラクトースと N - アセチルグルコサミンからラクト - N - ビオースを生成させることができる。

(18) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、C T P の前駆物質から C T P を生産する能力を有する微生物、糖と C T P から C M P - N e u A c を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、オロト酸と N - アセチルマンサミンとピルビン酸とラクト - N - ビオースからシアリルラクト - N - ビオースを生成させることができる。

(19) ヒト由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] を発現する動物細胞、G T P の前駆物質から G T P を生産する能

力を有する微生物、糖とGTPからGDP- α -Fucを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースと3-シアリルN-アセチルラクトサミンからシアリル α -Xを生成させることができる。

(20) α -1,3/1,4-7コシルトランスフエラーゼ [Carbohydrate Research, 190, 1 (1989)]、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP- α -Fucを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースとシアリルラクト-N-マンノースからシアリル α -Xを生成させることができる。

(21) 酵母由来の α -1,2-マンノシルトランスフエラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [J. Org. Chem., 58, 3985 (1993)]、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP- α -Manを生産する能力を有する微生物の培養または該培養液の処理物とを酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースとマンノースからMan α -1-2Manを生産させることができる。

等をあげることができる。

複合糖質の製造法は、上記に記載された例に限定されるものではなく、本特許に記載された糖ヌクレオチド製造法と組み合わせることができる糖転移酵素、および該酵素が許容する基質特異性の範囲において、どのような糖鎖でも、ヌクレオチドの前駆物質、糖、複合糖質前駆物質のみを原料として工業的に製造することが可能である。

本発明の製造方法により製造される複合糖質として、例えば、

(1) 病原性微生物やウイルスの感染に関与する複合糖質類、例えば、病原性微生物やウイルスの受容体として認識される複合糖質類、

(2) 病原性微生物やウイルスが生産する毒素の受容体として認識される複合糖質類、

(3) 生体内で、細胞接着、異物の認識、各種リソファインの結合等に関与する

複合糖質類、

等の、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルクロナ酸、マノース、N-アセチルマノサミン、フコース、シアル酸等の糖を、単独あるいは複数、化学的に許容される結合形式で含有

する複合糖質をあげることができ、より具体的には、

(1) ヒトや動物のミルク中に含有される乳幼児の微生物感染防御に関与する複合糖質類、例えば、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース等の複合糖質、

(2) *Escherichia coli*, *Propionibacterium granulosum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* 等の微生物を認識する受容体複合糖質、

(3) イソフルエンザウイルス、コロナウイルス、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルス、レオウイルス、ロタウイルス、エイズウイルス、等のウイルスの受容体複合糖質、

(4) クリプトスポリジウム、トリパノゾアなどの原虫の受容体複合糖質
(5) コレラ毒素、大腸菌易熱性毒素、ボツリヌス毒素、クロストリジウムの毒素、クロストリジウムA毒素、志賀毒素、ペロ毒素、志賀毒素様毒素、腸炎毒素、リオ耐熱性毒素、破傷風毒素、等の毒素が結合する受容体複合糖質、

(6) GD3, GM3 等のガングリオシドやグロホ系糖脂質等の、ガン関連複合糖質、

(7) シアリルイスX糖鎖等の、白血球の炎症部位への接着や機能修飾に関与する複合糖質類、

(8) 慢性関節リウマチやIgA腎症等の自己免疫疾患に関与する複合糖質類、

(9) 異物認識やカン細胞の認識に関与する各種のレクチン様物質が認識する複合糖質類等をあげることができる。

水性媒体中に生成した複合糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる。

[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 3289 (1988)、Anal. Biochem., 174, 459 (1988)]。

反応液中に生成した複合糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、N-アセチルラクトサミンにおいては J. Org. Chem., 47, 5416 (1982) 記載の方法に準じて行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

以下に本発明の実施例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. galU、p pa を発現する組換え体プラスミドの造成

galU、p pa を発現する組換え体プラスミド pNT12 の造成方法について以下に述べる (図 1、図 2)。

1) P₁プロモーターを含む発現ベクターの造成

P₁プロモーターを含む発現ベクターである pPA31 および pPAC31 は以下に示す方法で造成した (図 1)。

トリプトファンプロモーターを含むプラスミド pTrs30 を保有するエシェリヒア・コリ JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) および P₁プロモーターを含むプラスミド pPA1 (特開昭 63-233798)、P₁プロモーターおよび cI857 リプレッサーを含むプラスミド pPAC1 (FERM BP-6054) を保有するエシェリヒア・コリを、それぞれ LB 培地 [バクトリプトン (アイワコ社製) 10 g/l、酵母エキス (アイワコ社製) 5 g/l、NaCl 5 g/l、pH を 7.2] に植

菌し、30℃で 18 時間培養した。

該培養により得られた菌体から前述の公知の方法により、pTrs30、pP

A1およびpPAC1プラスミドDNAを単離精製した。
 精製したpTrS30 DNA 0.2 μ gを制限酵素Pst IおよびC1a I
 IIキット(Bio 101社製)により3.4 kbの断片を回収した。精製したp
 PA1 DNA 0.5 μ gを制限酵素Pst IおよびC1a Iで切断後、アガロ
 ースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.0 kbの断片を回収し
 た。

該3.4 kbの断片および1.0 kbの断片をライゲーションキット(TAKARA
 ligation Kit、宝酒造社製)を用いて、16°Cで16時間、連結反応を行った。
 該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリNM522株を前述の方法に従っ
 て形質転換し、該形質転換体をアスピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地
 に塗布後、37°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミド
 を抽出し、P₁プロモーターによる発現ベクターであるpPA31を得た。該プ
 ラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第1図)。
 精製したpPA31 DNA 0.2 μ gを制限酵素Pst IおよびC1a Iで
 切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリー
 IIキットにより3.4 kbの断片を回収した。精製したpPAC1 DNA 0.5
 μ gを制限酵素Pst IおよびC1a Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によ
 りDNA断片を分離し、同様に2.3 kbの断片を回収した。

該3.4 kbの断片および2.3 kbの断片をライゲーションキットを用いて、
 16°Cで16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリNM522株を前述の公知の方法に従っ
 て形質転換し、該形質転換体をアスピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地
 に塗布後、37°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミド
 を抽出し、cI857リプレッサーを含むP₁プロモーターによる発現ベクター

である p P A C 3 1 を取得した。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 1 図)。

2) g a 1 U 発現プラスミドの造成

エシエリヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を公知の方法 [例えば Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc. (1994)] により単離精製した。

配列番号 1 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 2 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製 380A・DNA 合成機を用いて合成した。

該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は W3110 染色体 DNA 0.04 μ g、プライマー各 0.5 μ M、TAKARA Ex Taq (宝酒造社製) 1.0 unit、10 \times Ex Taq 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l、deoxy NTP 各 200 μ M を含む反応液 40 μ l を用い、94 $^{\circ}$ C—1分、42 $^{\circ}$ C—2分、72 $^{\circ}$ C—3分の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1/10 量をアカロースゲル電気泳動にかけ、目的の断片が増幅されていることを確認後、残りの反応液と等量の TE (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA) 飽和フェノール/クロロホルム (1 v o 1 v o 1) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷フェノールを加えて混合し、-80 $^{\circ}$ C に 30 分放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。該沈殿を 70% 冷フェノールで洗浄し、真空乾燥して沈殿を得た。以後、TE 飽和フェノール/クロロホルムを添加し、エタノールで洗浄した DNA の沈殿を得るまでの操作をエタノール沈殿法と呼ぶ。

該 DNA の沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d Ⅲ および B a m H I で切断し、アカロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジークリーシットにより 0.9 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した p P A C 3 1 DNA 0.2 μ g を制限酵素

H i n d ⅢおよびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離し、同様に4. 2 k bの断片を回収した。

該0. 9 k bの断片および4. 2 k bの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリKY8415株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、g a l U、p p a発現プラスミドであるp N T 9を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第2図)。

3) g a l U, p p a同時発現プラスミドの造成

配列番号3記載のセンズ鎖D N Aプライマーと、配列番号4記載のアンチセンス鎖D N Aプライマーを合成し、該合成D N Aをプライマーとして、W3110株の染色体D N Aを鋳型として前述と同一の条件でP C Rを行った。

P C R終了後、エタノール沈殿法により、D N Aの沈殿を取得した。該沈殿を20 μ lのT Eに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、D N Aを制限酵素B a m H IおよびS a l Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離した後、ジーンクリップIIキットにより1. 0 k bの断片を回収した。実施例1-2)で取得したp N T 9 D N A 0. 2 μ gを制限酵素B a m H IおよびS a l Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離し、同様に4. 9 k bの断片を回収した。

該1. 0 k bの断片および4. 9 k bの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリKY8415株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミド

を抽出し、g a l u, p p a 同時発現プラスミドである p N T 1 2 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第2図)。

該 p N T 1 2 D N A 0.5 μ g を制限酵素 E c o R I および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により D N A 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収した。

該 2.2 kb の断片および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をクロラムフェニコール 10 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g a l u, p p a 遺伝子発現プラスミドである p N T 3 2 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

実施例 2. U D P - G l c の生産

実施例 1 で得たエシエリヒア・コリ KY8415/pNT12 株を、アムピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 125 ml の入った 1 L 容バツフル付き三角フラスコに接種し、30°C で 220 r p m の条件で 17 時間培養した。該培養液 125 ml エキス(テイクコ社製) 24 g/l、K H₂P O₄ 2.3 g/l (別殺菌)、K₂H P O₄ 12.5 g/l (別殺菌)、アムピシリン 50 μ g/ml の組成からなる液体培地(pH 無調整) 2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、30°C で 4 時間、更に、40°C で 3 時間、600 r p m、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。

該培養中、28% アセトニク水を用いて、培養液の pH を 7.0 に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し、

湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アゼモニアケネス ATCC21170 株を、グルコース 5.0 g

$/1$ 、ポリバクトン (日本製薬社製) $1.0\text{ g}/1$ 、酵母エキスを (オリエンタル酵母社製) $1.0\text{ g}/1$ 、尿素 $5.0\text{ g}/1$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $5.0\text{ g}/1$ 、 KH_2PO_4 $1.0\text{ g}/1$ 、 K_2HPO_4 $3.0\text{ g}/1$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.0\text{ g}/1$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.1\text{ g}/1$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.0\text{ g}/1$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ $2.0\text{ g}/1$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ $2.0\text{ g}/1$ 、 L -システイン $2.0\text{ g}/1$ 、 D -パントチン酸カルシウム $1.0\text{ g}/1$ 、ピタミツ B1 $5.0\text{ g}/1$ 、ニコチン酸 $5.0\text{ g}/1$ 、およびピオチン $3.0\text{ g}/1$ (1.0 N NaOH で pH 7.2 に調整) の組成からなる液体培地 2.0 ml の入った 3.0 ml 容バツフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で、 24 時間培養した。

該培養液 2.0 ml を上記と同一組成の液体培地 2.5 ml の入った 2 L 容バツフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で、 24 時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液 2.5 ml を、グルコース $1.5\text{ g}/1$ 、肉エキスを (極東製薬社製) $5.0\text{ g}/1$ 、 KH_2PO_4 $1.0\text{ g}/1$ 、 K_2HPO_4 $1.0\text{ g}/1$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.0\text{ g}/1$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.1\text{ g}/1$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.0\text{ g}/1$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ $2.0\text{ g}/1$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ $2.0\text{ g}/1$ 、 L -システイン $2.0\text{ g}/1$ 、ピオチン $1.0\text{ g}/1$ 、尿素 $2.0\text{ g}/1$ 、およびピタミツ B1 $5.0\text{ g}/1$ (別殺菌) (1.0 N NaOH で pH 7.2 に調整) の組成からなる液体培地 2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、 32°C で 600 rpm 、通気量 $2.5\text{ L}/\text{min}$ の条件で 24 時間培養を行った。培養中、 28% アゼモニア水を用いて、培養液の pH を 6.8 に維持した。

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C

で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ KY8415/pNT12 株湿菌体 4.0 g / 1、コリネバクテリウム・フシモニアゲナス ATCC21170 株湿菌体 1.50 g / 1、グルコース 1.00 g / 1、 KH_2PO_4 2.0 g / 1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g / 1、フイチン酸 5.0 g / 1、オロト酸 (カリウム塩) 2.1 g / 1、ナイミーン S-2 1.5 g / 1、キシレン 1.0 ml / 1 の組成からなる反応液 3.0 ml を 2.00 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で21時間反応を行った。

反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてグルコース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 4.3 g / 1 の UDP-P-Glc (2Na 塩) が生成した。

実施例 3. g a 1 T、g a 1 K を発現する組換え体プラスミドの造成
g a 1 T、g a 1 K を発現する組換え体プラスミド p N T 2 5 の造成方法について以下に述べる (第 3 図)。

配列番号 5 記載のセンス鎖 D N A プライマーと、配列番号 6 記載のアンチセンス鎖 D N A プライマーを合成し、該合成 D N A をプライマーとして、W3110 株の染色体 D N A を鋳型として前述と同一の条件で P C R を行った。

P C R 終了後、エタノール沈殿法により D N A の沈殿を取得した。該 D N A 沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、D N A を制限酵素 H i n d Ⅲ および H i n c Ⅱ で切断後、アガロースゲル電気泳動により D N A 断片を分離した後、ジエタリオン II キットにより 2.3 kb の断片を回収した。

pBluescript II SK+ D N A 0.2 μ g を制限酵素 H i n d Ⅲ および E c o R V で切断し、アガロースゲル電気泳動により D N A 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収した。

該 2.3 kb の断片および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間連結反応を行った。
 該連結反応液を用いてエシェリヒ・コリ NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK遺伝子を含むプラスミドであるpNT19を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第3図)。

該pNT19 DNA0.5 μ gを制限酵素C1a1およびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に2.3 kbの断片を回収した。実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA0.2 μ gを制限酵素C1a1およびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

該2.3 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒ・コリ NM52株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK同時発現プラスミドであるpNT25を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第3図)。

実施例4. UDP-Galの生産

1) galT、galK、galU、ppa発現株の造成

実施例1-3)で得たpNT32 DNAを用いてエシェリヒ・コリ NM522/pNT25株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピシリン50 μ g/mlおよびクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体を選択することにより、g

NM522/pNT25/pNT32株を得た。

2) UDP-Galの生産

実施例4-1)で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。

また、コリネバクテリウム・フンモノアゲナス ATCC21170株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32株湿菌体 50g/l、コリネバクテリウム・フンモノアゲナス ATCC21170株湿菌体 150g/l、グルコース 80g/l、ガラクトース 20g/l、 KH_2PO_4 15g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g/l、フイチン酸 5g/l、オロト酸 (カリウム塩) 21.2g/l、ナイミーンS-215 4g/l、キシレン 10ml/lの組成からなる反応液2Lを5L容培養槽に入れ、該反応液を600rpmにて攪拌し、1L/m³に²にて通気し、32℃で26時間反応を行った。

反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpH7.2に維持し、必要に応じて、グルコース、ガラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に47.4g/lのUDP-Gal (2Na塩)が生成了した。

実施例5. GalT、GalKをコリネバクテリウム・フンモノアゲナスで発現する組織え体プラスミドの造成

エシエリヒア・コリ由来のGalT、GalKをコリネバクテリウム・フンモノアゲナスで発現する組織え体プラスミドpTK7の造成方法について以下に述べる (第4図)。

1) pCG116の造成

コリネバクテリウム・アゼモニアゲナスで複製できるプラスミド pCG116 の造成を以下に行った。

プラスミド pCG11 (特公平6-91827) DNA0, 5 μ g を制限酵素 Pst I および Sfu I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーニングキットにより 6, 5 kb の断片を回収した。

一方、プラスミド pUC19 DNA1, 0 μ g を制限酵素 EcoRI で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) により平滑末端化した該 DNA を Pst I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、MERmaid Kit (Bio101 社製) により 4.3 kb の断片を回収した。

該 6, 5 kb の断片および 4.3 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16°C で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてコリネバクテリウム・アゼモニアゲナス ATCC21170 株をエレクトロポレーション法 [FEMS Microbiol. Lett., 65, 299 (1989)] で形質転換し、該形質転換体をスベクチノマイシン 100 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30°C で 2 日間培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法 [J. Bacteriol., 159, 306 (1984)] に従ってプラスミドを抽出し、プラスミド pCG116 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 4 図)。

2) ga1T, ga1K を発現するプラスミド pTK7 の造成
実施例 3 で造成した ga1T, ga1K を発現するプラスミド pNT25 DNA A1, 0 μ g を制限酵素 Xho I および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーニングキットにより 3, 5 kb の断片を回収した。

一方、実施例 5-1) で造成したプラスミド pCG116 DNA0, 5 μ g を制限酵素 Sma I および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 6, 5 kb の断片を回収した。

該 3, 5 kb の断片および 6, 5 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてコリネバクテリウム・アシモニアゲネス ATCC21170 株をエレクトロポレーション法で形質転換し、該形質転換体をスベクチノマイシン 100 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で2日間培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK 同時発現プラスミドである pTK7 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第4図)。

実施例 6. UDP-Gal の生産

実施例 5 で得たコリネバクテリウム・アシモニアゲネス ATCC21170/pTK7 株を実施例 2 と同様の方法で 32℃で 20 時間培養した後、40℃で 4 時間培養し、得られた培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて 0℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アシモニアゲネス ATCC21170/pTK7 株湿菌体 150 g / l、グルクトース 40 g / l、ガラクトース 20 g / l、 KH_2PO_4 15 g / l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g / l、フイチン酸 5 g / l、オロツト酸 (カリウム塩) 10.6 g / l、ナイミーン S-2154 g / l、キシレン 10 ml / l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で 2 時間反応を行った。

反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH 7.2 に維持し、必要に応じて、グルクトース、ガラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 7.2 g / l の UDP-Gal (2Na 塩) が生成した。

実施例 7. galM⁺、galP⁺、galM⁺、galK⁺、p f k B 発現プラスミドの造成

1) g l m U、p p a 発現プラスミドの造成

配列番号 7 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 8 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該 DNA 沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 1.4 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した p P A 3 1 DNA 0.5 μ g を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 4.2 kb の断片を回収した。

該 1.4 kb の断片および 4.2 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション 50 μ g / ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、g l m U 発現プラスミドである p N T 1 0 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 5 図)。

実施例 1-3) で取得した p N T 1 2 DNA 0.5 μ g を制限酵素 B a m H I および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 1.0 kb の断片を回収した。上記 p N T 1 0 DNA 0.2 μ g を制限酵素 B a m H I および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.3 kb の断片を回収した。

該 1.0 kb の断片および 5.3 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従

って形質転換し、該形質転換体をアゼシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、p p a 同時発現プラスミドである p NT 14 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 5 図）。

2) p g m 発現プラスミドの造成

配列番号 9 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 10 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により、DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Cla I および Bam HI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクレーン II キットにより 1.8 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した p PAC 31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 Cla I および Bam HI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 1.8 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアゼシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、p g m 発現プラスミドである p NT 24 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 6 図）。

3) g 1 m 発現プラスミドの造成

配列番号 11 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 12 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリ

ヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行

った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 2

0 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Cla I お

よび Bam HI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、

ジーンクリーニングキットにより 1. 6 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で

取得した pPAC31 DNA 0. 2 μ g を制限酵素 Cla I および Bam HI

で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5. 5 k

b の断片を回収した。

該 1. 6 kb の断片および 5. 5 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16°C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、

該形質転換体をアスピレーション 50 μ g / l を含む LB 寒天培地に塗布後、30°C

で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、

1 mM 発現プラスミドである pNT4 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素

消化により確認した (第 7 図)。

4) g1k 発現プラスミドの造成

配列番号 13 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 14 記載のアンチセ

ンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリ

ヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行

った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得し、該沈殿を 20

μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Hind III お

よび Bam HI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、

ジーンクリーニングキットにより 0. 5 kb の断片を回収した。

実施例 1-1) で取得した pPAC31 DNA 0. 2 μ g を制限酵素 Hind

ⅢおよびB a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離し、同様に4. 2 k bの断片を回収した。

該0. 5 k bの断片および4. 2 k bの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒ・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリッ50 μ g / lを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g I kの一部を有するプラスミドであるp N T 4 5を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第8図)。

上述と同一の条件でP C Rを行い、得られたD N A溶解液5 μ lを用い、D N Aを制限酵素H i n d Ⅲで切断後、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離し、同様に0. 5 k bの断片を回収した。上に記した方法で取得したp N T 4 5 D N A 0. 2 μ gを制限酵素H i n d Ⅲで切断後アルカリホスファターゼにより脱リン酸化処理を行い、アガロースゲル電気泳動によりD N A断片を分離し、同様に4. 7 k bの断片を回収した。

該0. 5 k bの断片および4. 7 k bの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒ・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリッ50 μ g / lを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g I kを発現するプラスミドであるp N T 4 6を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第8図)。

5) p f k B発現プラスミドの造成

配列番号15記載のセンス鎖D N Aプライマーと配列番号16記載のアンチセンス鎖D N Aプライマーを合成した。該合成D N Aをプライマーとし、W3110株の染色体D N Aを鋳型として前述と同一の条件でP C Rを行った。

P C R終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。該沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素H i n d IIIおよびE c o R Vで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、bluescript II ジェンクレーションIIキットにより1.3 kbの断片を回収した。pBluescript II SK+ DNA 0.2 μ gを制限酵素H i n d III およびE c o R Vで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該1.3 kbの断片および3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて16°Cで16時間連結反応を行った。該形質転換体を用いてエシェリヒア・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後30°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p f k B遺伝子を保有するプラスミドpNT43を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第9図)。

pNT43 DNA 0.5 μ gを用い、DNAを制限酵素C l a IおよびS a c Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.3 kbの断片を回収した。

実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2 μ gを制限酵素C l a IおよびS a c Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.7 kbの断片を回収した。

該1.3 kbの断片および5.7 kbの断片をライゲーションキットを用いて16°Cで16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p

f k B 発現プラスミドである p N T 4 7 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 9 図)。

実施例 8. U D P - G l c N A c の生産

実施例 7 で得た エシエリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、

NM522/pNT44 株、NM522/pNT47 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた

各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて 2

0℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT24 株湿菌体 6 g / 1、NM522/pNT47 株湿菌体 6

g / 1、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、6 mM MgCl₂・6

H₂O、10 mM グルコース-6-リン酸、2.5 mM フルクトース-6-リン酸、

2.5 mM ATP、ナイミーン-S-2154 g / 1 の組成からなる反応液 0.

1 ml を 1.5 ml 容チューブに入れ、37℃で 1 時間反応を行った。反応液を

65℃で 5 分間処理後、エシエリヒア・コリ KY8415/pNT14 株湿菌体 0.3 g /

1、NM522/pNT44 株湿菌体 6 g / 1、5 mM グルコサミン-6-リン酸、5 mM ア

セチル CoA、5 mM UTP となるように菌体および基質を添加し、さらに 3

7℃で 30 分間反応させたところ、反応液中に 2.5 mM (1.6 g / 1) の U

D P - G l c N A c (2 Na 塩) が生成した。この際、エシエリヒア・コリ

NM522/pNT24 株湿菌体あるいは NM522/pNT47 株湿菌体を添加しなかった場合の U

D P - G l c N A c 生成量はそれぞれ 0.08 mM、0.16 mM であった。

このことは、p g m 発現株と p f k B 発現株の組み合わせにより、g l m M の

活性発現に必要な G l c - 1, 6 - P 2 が供給できることを示している。

実施例 9. U D P - G l c N A c の生産

実施例 7 で得た エシエリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、

NM522/pNT44 株、NM522/pNT46 株、NM522/pNT47 株を実施例 2 と同様の方法で培養

し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテ

リウム・アノモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、NM522/pNT44 株、

NM522/pNT47 株、NM522/pNT46 株湿菌体を各 1.0 g/l 、コリネバクテリウム・

アノモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 1.50 g/l 、フルクトース 5.0 g/l 、

グルコサミン塩酸塩 8.0 g/l 、 KH_2PO_4 1.5 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 g/l 、フイチン酸 5 g/l 、オロト酸 (カリウム塩) 1.0 g/l 、ナイ

ミン S-2154 4 g/l 、キシレン 1.0 ml/l の組成からなる反応液 3.0

ml を 2.00 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマクネタイツク・スターラー

にて攪拌 (900 rpm) し、 32°C で 10 時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応

じてフルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 6.2 g/l の UDP-GlcNAc (2Na

塩) が生成した。

実施例 10. ga1K 発現プラスミドの造成

実施例 3-1) で取得した pNT25 DNA ($0.5\text{ }\mu\text{g}$ を制限酵素 ClaI

および EcoRV で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、

ジーンクリーニングキットにより 6.7 kb の断片を回収した。回収した DNA を

DNA Blunting Kit により平滑末端化した後、ライゲーションキットを用いて 1

6°C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、

該形質転換体をアスピリン $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後 30°C

で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、

ga1K 発現プラスミドである pNT54 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素

消化により確認した(第10図)。

実施例11. UDP-GlcNAcの生産

実施例10で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNT54株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス ATCC21170株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT54株湿菌体5.0g/l、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス ATCC21170株湿菌体15.0g/l、フルクトース4.0g/l、N-アセチルグルコサミン6.7g/l、 KH_2PO_4 1.5g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g/l、アイチン酸5g/l、オロト酸(カリウム塩) 1.0g/l、ナイミーンS-215.4g/l、キシレン1.0ml/lの組成からなる反応液3.0mlを2.00ml容ビーカーに入れ、この反応液をマクネチャック・スターラーにて攪拌(900rpm)し、32℃で27時間反応を行った。

反応中4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に17.1g/lのUDP-GlcNAc (2Na塩)が生成した。

実施例12. UDP-GlcNAcとUDP-Galの同時生産

実施例3で得たNM522/pNT25株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス ATCC21170株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25株湿菌体2.5g/l、コリネバクテリウム・

アノモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 15.0g / 1、フルクトース 6.0g / 1、
 N-アセチルグルコサミン 5.0g / 1、ガラクトース 4.0g / 1、 KH_2PO_4
 15g / 1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g / 1、フイチン酸 5g / 1、オロツト酸
 (カリウム塩) 10g / 1、ナイミーン S-215 4g / 1、キシレン 10
 ml / 1 の組成からなる反応液 30ml を 200ml 容ビーカーに入れ、この反
 応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900rpm) し、32℃で24
 時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応
 じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 11.4g / 1 の UDP-GlcNAc (2Na
 塩) および 18g / 1 の UDP-Gal (2Na 塩) が生成した。

実施例 13. manB、manC、pGm、pfkB 発現プラスミドの造成
 1) manB、manC 発現プラスミドの造成

配列番号 17 記載のセンズ鎖 DNA プライマーと配列番号 18 記載のアンチセ
 ンズ鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシエリ
 ヒア・コリ W3110 株染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行っ
 た。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 2
 μl の TE に溶解した。該溶解液 5 μl を用い、DNA を制限酵素 HindIII
 および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、
 ジンクレーションキットにより 3.0kb の断片を回収した。pBluescript II
 SK+ DNA 0.2 μg を制限酵素 HindIII および BamHI で切断後、アガ
 ロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.0kb の断片を回収
 した。

該 3.0kb の両断片をライゲーションキットを用いて 16℃で 16 時間連結
 反応を行った。該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリ NM522 株を常法に従っ

て形質転換し、該形質転換体をアゼシリン⁵⁰ 50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、manBおよびmanBを含むプラスミドであるpNK6を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第11図)。

該pNK6 DNA 0.5 μ gを制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し3.0 kbの断片を回収した。実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2 μ gを制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し同様に5.5 kbの断片を回収した。

該3.0 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアゼシリン⁵⁰ 50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、manCおよびmanB発現プラスミドであるpNK7を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第11図)。

2) p g m、p f k B同時発現プラスミドの造成
実施例7で取得したpNT24 DNA 0.5 μ gを制限酵素Xho IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離しジーンクリーニングキットにより3.0 kbの断片を回収した。一方、pSTV28 DNA (宝酒造社製) 0.2 μ gを制限酵素Sma IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリNM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB

寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。
生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p
g m 遺伝子を有するプラスミドである p N T 5 3 を得た。該プラスミドの構造を
制限酵素消化により確認した（第 1 2 図）。

配列番号 1 9 記載のセンス鎖 DNA プライマーを合成し、該センス鎖 DNA プ
ライマーおよび配列番号 1 6 記載のアナログセンス鎖 DNA プライマーを用い、実
施例 7 で取得したプラスミド p N T 4 7 DNA を鋳型として前述と同一の条件

で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 2
0 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Eco R V
および B g I II で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、
同様に 1. 3 k b の断片を回収した。p N T 5 3 DNA 0. 2 μ g を制限酵素
S m a I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片
を分離し、同様に 6. 0 k b の断片を回収した。

該 1. 3 k b の断片および 6. 0 k b の断片をライゲーションキットを用いて
1 6℃で 1 6 時間連結反応を行った。
該形質転換体をクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む LB 寒天培地に塗布
後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p
g m および p f k B 発現プラスミドである p N T 5 5 を得た。該プラスミドの構
造を制限酵素消化により確認した（第 1 2 図）。

実施例 1 4. GDP-M a n の生産

1) m a n B、m a n C、p g m、p f k B 発現株の造成

実施例 1 3-2) で得た p N T 5 5 DNA を用いてエシエリヒフ・コリ

NM522/pNK7 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリリン 5 0 μ g

／m l およびクロラムフェニコール 10 μ g／m l を含む B 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体を選択することにより、man B、man C、pgm、pfkB 発現株であるエシエリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株を得た。

NM522/pNK7/pNT55 株を得た。

2) GDP-Man の生産

上記 1) で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株および実施例 7 で得

たエシエリヒア・コリ NM522/pNT46 を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた
 各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・フシ
 モニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を
 遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存すること
 が可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株湿菌体 2.5 g／l、NM522/pNT46 株湿
 菌体 2.5 g／l、コリネバクテリウム・フシモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体

150 g／l、フルクトース 60 g／l、マシノース 50 g／l、KH₂PO₄
 15 g／l、MgSO₄・7H₂O 5 g／l、フイチン酸 5 g／l、GMP

(2Na, 7H₂O 塩) 60 g／l、ナイミーン S-215 4 g／l、キシリ

ン 10 m l／l の組成からなる反応液 30 m l を 200 m l 容ビーカーに入れ、
 この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 r p m) し、24 時

間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応

じて KH₂PO₄ を添加した。

該反応により、反応液中に 14.6 g／l の GDP-Man (2Na, 1H₂O

O 塩) が生成した。

実施例 15. gmd、wcaG 発現プラスミドの造成

配列番号 20 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 21 記載のアンチセ
 ンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシエリ

ヒア・コリ W3110 株染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Hind III および Xho I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、インクリーション II キットにより 2.3 kb の断片を回収した。

実施例 1-1) で取得した pPA31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 Hind III および Sal I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.9 kb の断片を回収した。

該 2.3 kb および 3.9 kb の断片をライゲーションキットを用いて、1

6°C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシエリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリシ 50 μ g/m l を含む LB 寒天培地に塗布後、3

0°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g

md および wcaG を含むプラスミドである pNK8 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 13 図)。

実施例 16. GDP-Fuc の生産

実施例 14 で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株、実施例 15 で得た NM522/pNK8 株および実施例 7 で得た NM522/pNT46 を実施例 2 と同様の方法で培養し得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アシモニアケナス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株湿菌体 25 g/l、エシエリヒア・コリ NM522/pNK8 株湿菌体 25 g/l、エシエリヒア・コリ NM522/pNT46 株湿菌

体 2.5 g / 1、コリネバクテリウム・フシモニアゲナス ATCC21170 株湿菌体
 1.5 g / 1、フルクトース 4.0 g / 1、マシノース 6.0 g / 1、KH₂PO₄
 1.5 g / 1、MgSO₄・7H₂O 5 g / 1、フクチン酸 5 g / 1、GMP (2
 Na / 7H₂O 塩) 6.0 g / 1、ナイミーン S-2 1.5 g / 1、キシレン 1.0
 ml / 1 の組成からなる反応液 3.0 ml を 2.0 ml 容量ビーカーに入れ、この反
 応液をマグネタイク・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で24
 時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に
 応じて KH₂PO₄ を添加した。

該反応により、反応液中に 1.0 g / 1 の GDP-Fuc (2.5 Na, 1H
 O 塩) が生成した。

実施例 17. neuA 発現プラスミドの造成

エシエリヒア・コリ K235 株 (ATCC13027) 染色体 DNA を実施例 1 と同様の方
 法で調製した。

配列番号 22 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 23 記載のアンチセ
 ス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシエリ
 ヒア・コリ K235 株 (ATCC13027) 染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で
 PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 2
 0 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 EcoRI
 および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、
 ジェンクリン II キットにより 1.3 kb の断片を回収した。pBluescript II

SK+ DNA 0.2 μ g を制限酵素 EcoRI および BamHI で切断後、アガ
 ロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収
 した。

該 1.3 kb および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃

で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリ NM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、ne u A遺伝子を含むプラスミドであるpTA12を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第14図)。

該pTA12 DNA 0.5 μ gを制限酵素C1a IおよびBam H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.3 kbの断片を回収した。実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2 μ gを制限酵素C1a IおよびBam H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。該1.3 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリ NM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、ne u A発現プラスミドであるpTA14を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第14図)。

実施例18. CMP-ne u A cの生産

実施例17で得たエシェリヒヤ・コリ NM522/pTA14株、C600/pNAL1株 [Appl. Environ. Microbiol., 51:562 (1986)] および JF646/pMW5株 [J. Biol. Chem., 261:5568 (1986)] を実施例2と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス ATCC21170株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使

用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pTA14 株湿菌体 5.0 g/l、エシエリヒア・コリ C600/pNAL1 株湿菌体 1.5 g/l、エシエリヒア・コリ JF646/pMW5 株湿菌体 2.5 g/l、コリネバクテリウム・アセモノアゲナス ATCC21170 株湿菌体 1.5 g/l、オロツト酸（カリウム塩）1.0 g/l、ピルピツ酸（Na 塩）2.0 g/l、1、フルクトース 4.0 g/l、N-アセチルアミノサミン 1.0 g/l、KH₂PO₄ 1.5 g/l、MgSO₄・7H₂O 5 g/l、フイチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 1.0 ml/l の組成からなる反応液 3.0 ml を 2.0 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、3.2℃で2.4時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH₂PO₄ を添加した。

該反応により、反応液中に 2.7 g/l の CMP-NaAc（Na 塩）が生

成した。

実施例 19. ラクト-N-チトラオースの生産

1) β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの調製

プロテインAの IgG 結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミド pAMoERSAW1（特開平 6-181759）で形質転換したナマルバク JM-1 株を G418（ギブコ社製）を 0.5 mg/ml 含む RPMI 640・ITPSGF 培地 3.0 ml に 5×10^4 ce/l になるように懸濁し、CO₂ インキュベーター中で 37℃で8日間培養した。

該培養液から遠心分離により細胞を除き上清を回収した。該上清は、必要に応じて -80℃で保存可能であり、使用前に解凍して使用することができる。

該プロテインAの IgG 結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質が生成された培養上清にアジ化ナトリウムを最終濃度 0.1% にな

るように添加した後、製品説明書に従って前処理した 1 g G セフproz (77
 ルマシア社製) を 50 μ l 添加し、4℃で一晩緩やかに攪拌した。
 攪拌後、遠心分離により β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの結合した I
 g G セフproz を回収し、RPMI 640 \cdot ITPSGF 培地 1 ml で 3 回洗
 浄後、該 I g G セフproz を β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの酵素源
 として用いた。

2) ラクト-N-チトラオースの生産

ラクト-N-ネオチトラオース (オックスフォード・グライコシアムズ社
 製) を公知の方法により [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って 2
 ーアミノピリジンにより蛍光標識した後、0.1 U の β -ガラクトシダーゼ (生
 化学工業社製) を加えて 37℃で 16 時間反応させ、非還元末端のガラクトース
 を除去した。

該反応液を、5 分間、100℃で加熱し、 β -ガラクトシダーゼを失活させた。
 該反応により得られた GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc を複合糖質前駆
 体として用いた。

該複合糖質前駆物質 0.5 mM、上記 1) で取得した I g G セフproz と結
 合 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ 0.5 U、実施例 4 で取得した U D
 P-Gal を含む反応液 6 μ l (5 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (p
 H 7.9) 10 mM MnCl₂、2 mM β -メルカプトエタノールの組成から
 なる反応液 36 μ l を、32℃で 6.5 時間放置し、反応を行った。
 反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を下記条件で HPLC を用いて定量
 した。

カラム: TSKgel ODS-80TM カラム (4.6mm x 30cm, TOSOH 社製)
 液相: 0.02 M 酢酸アモニウム緩衝液 (pH 4.0)
 温度: 50℃
 流速: 1 ml/min
 検出: 蛍光検出器 (励起波長 320 nm、放射波長 400 nm)

生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-ネオテトラオースと標識された生成物の溶出時間を比較することにより行われた。

該反応により 0.17 mM (0.12 g/l) のラクト-N-ネオテトラオースが生成了。

実施例 20. ラクト-N-ネオテトラオースの生産

実施例 19 と同様な方法で、ラクト-N-ネオテトラオースから G1cNAc β 1-3Gal β 1-4Glc を調製し、複合糖質前駆体として用いた。

該複合糖質前駆体 0.5 mM、 β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (シグマ社製) 0.5 U、実施例 4 で取得した UDP-Gal を含む反応液 6 μ l (5 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.9)、10 mM MnCl₂、2 mM β -メルカプトエタノールの組成からなる反応液 36 μ l を、32°C で 5 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を、実施例 19-2) と同様の条件で、HPLC を用いて定量した。なお、生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-ネオテトラオースと生成物の溶出時間を比較することにより行われた。

該反応により、0.15 mM (0.11 g/l) のラクト-N-ネオテトラオースが生成了。

実施例 21. ラクト-N-7コペンタオース III の生産

α 1,3-7コシルトランスフェラーゼの結合した IgG セフテロースはプロテイン A の IgG 結合領域と α 1,3-7コシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミド pAMoA-FT6 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] で形質転換したナマルバク JM-1 株から実施例 19-1) と同様な方法で調製し、 α 1,3-7コシルトランスフェラーゼの酵素源として用いた。

ラクト-N-ネオテトラオース (オックスフォード・グライコシステム社

製) 0.25 mM、1 g セフprozess結合 α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ 1.0 U、実施例 16 で取得した GDP-Fuc を含む反応液 6 μ l (0.25 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.9)、10 mM MnCl₂ の組成からなる反応液 50 μ l を、37°C で 24 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物をタイオネックス社の糖分析装置 (DX-500) にて定量した。なお、生成物の同定はラクト-N-フコペントオース III (オックスフォード・グライコシステムズ社製) と生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.21 mM (0.18 g/l) のラクト-N-フコペントオース III が生成した。

実施例 22. α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (1 g t c) 発現プラス ミノの造成

Neisseria gonorrhoeae (ATCC33084 株) 染色体 DNA を実施例 1 と同一の方法で調製した。

配列番号 24 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 25 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、

Neisseria gonorrhoeae (ATCC33084 株) 染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 HincII および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジエタリ-シロキットにより 1.0 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した pPA31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 HincII および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 4.2 kb の断片を回収した。

該 1.0 kb の断片および 4.2 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアスピレーション50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、1gtC発現プラスミドであるpGT3を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第15図)。

実施例23. グロボトリオースの生産

実施例4で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32株、実施例22で得たエシェリヒア・コリ NM522/pGT3株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・フジモニアゲネス ATCC21170株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することができ、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32株湿菌体 50g/l、エシェリヒア・コリ NM522/pGT3株湿菌体 50g/l、コリネバクテリウム・フジモニアゲネス ATCC21170株湿菌体 150g/l、グルクトース 100g/l、ガラクトース 100g/l、ラクトース 100g/l、KH₂PO₄ 15g/l、MgSO₄・7H₂O 5g/l、フイチン酸 5g/l、オロツト酸(カリウム塩) 10g/l、ナイミーンS-2154g/l、キシリン 10ml/lの組成からなる反応液30mlを200ml容ビーカーに入れ、この反応液をマグネタイツク・スターラーにて攪拌(900rpm)し、32℃で36時間反応を行った。

反応中は4N NaOHを用いて該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてガラクトース、ラクトース、グルクトース、KH₂PO₄を添加した。

該反応により、反応液中に188g/lのグロボトリオースが生成した。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清10mlから、活性炭を用いる方法により精製を行い、グロボトリオースの白色粉末1.5gを得た。

実施例 4 で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株、実施例 2 で得たエシエリヒア・コリ NM522/pGT3 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アソモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

が可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株湿菌体 50 g / 1、エシエリヒア・コリ NM522/pCT3 株湿菌体 50 g / 1、コリネバクテリウム・フシモニアケネス ATCC21170 株湿菌体 150 g / 1、フルクトース 50 g / 1、ガラクトース 50 g / 1、N-アセチルラクトサミン 96 g / 1、 KH_2PO_4 15 g / 1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g / 1、フイチン酸 5 g / 1、ナロット酸 (カリウム塩) 10 g / 1、ナイミーン S-2154 g / 1、キシレン 10 ml / 1 の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容量ビーカーに入れ、この反応液をペグネチイック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32°C で 23 時間反応を行った。

反応中は $4\text{N}_2\text{NaOH}$ を用いて該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてガラクトース、フルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反應により、反應液中に 1.0×10^{-4} の $G a^{1+}$ 、 1.4×10^{-4} の $G a^{3+}$ 、 1.4×10^{-4} の $N A$ が生成した。

該反應液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清 3.0 ml から、活性炭を用いる方法により生成物を精製し、Ga1 α 1-4 Ga1 β 1-4 G1cNAc の白色粉末 0.2 g を得た。

実施例 25. 3, 1, 4-ガラクトシルトラネステラゼ (1 g t B) 発現プラスミドの造成

配列番号 26 記載のセックス鎖 DNA プライマーと配列番号 27 記載のアンチセ

シス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとし、N. gonorrhoeae (ATCC33084株) 染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。該沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジェンクレーションIIキットにより0.8kbの断片を回収した。pBluescriptII SK+ DNA 0.2 μ gを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0kbの断片を回収した。

該0.8kbおよび3.0kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃、16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリ NM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアプレシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、gtB遺伝子を含むプラスミドであるpNT60Pを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第16図)。

該pNT60P DNA 0.5 μ gを制限酵素C1aIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5kbの断片を回収した。

該0.8kbの断片および5.5kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃、16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒヤ・コリ NM522株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアプレシリン50 μ g/ml Iを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、1

g t B 発現プラスミドである p N T 6 0 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 1 6 図)。

実施例 2 6. N-アセチルグルコサミンの生産

実施例 2 5 で得た エシエリヒア・コリ NM522/pNT25 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃ で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 50 g / 1、エシエリヒア・コリ NM522/pNT60 株湿菌体 50 g / 1、コリネバクテリウム・アノモニアゲナス

ATCC21170 株湿菌体 150 g / 1、オロト酸 (カリウム塩) 10 g / 1、グルコース 100 g / 1、N-アセチルグルコサミン 100 g / 1、ガラクトース 100 g / 1、 KH_2PO_4 15 g / 1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g / 1、フイチン酸 5 g / 1、サトウキビ 215 g / 1、キシレン 10 ml / 1 の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液を

マグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃ で 34 時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてガラクトース、グルコース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 114 g / 1 の N-アセチルグルコサミンが生成した。

実施例 2 7. ラクトースの生産

実施例 2 5 で得た エシエリヒア・コリ NM522/pNT60 株、実施例 3 で得た エシエリヒア・コリ NM522/pNT25 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の

培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アジモニア
ゲナス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分
離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能
で、使用前に解凍して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 5.0 g/l 、エシエリヒア・コリ
NM522/pNT60 株湿菌体 5.0 g/l 、コリネバクテリウム・アジモニアゲナス
ATCC21170 株湿菌体 1.50 g/l 、オロツト酸（カリウム塩） 1.0 g/l 、グ
ルコース 11.5 g/l 、ガラクトース 11.5 g/l 、 KH_2PO_4 1.5 g/l 、
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l 、フイチン酸 5 g/l 、ナイミーン S-215
 4 g/l 、キシレン 1.0 ml/l の組成からなる反応液 3.0 ml を 2.00 ml
容ビーカーに入れ、この反応液をマクネタイツク・スターラーにて攪拌（ 900
 rpm ）し、 32°C で 15 時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応
じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 4.9 g/l のラクトースが生成した。

実施例 28. クロトリオースの生産

実施例 25 で得たエシエリヒア・コリ NM522/pNT60 株、実施例 3 で得たエシエ
リヒア・コリ NM522/pNT25 株および実施例 22 で得たエシエリヒア・コリ

NM522/pGT3 を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離
し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アジモニアゲナス ATCC21170
株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得
した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍
して用いることができる。

エシエリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 5.0 g/l 、エシエリヒア・コリ
NM522/pNT60 株湿菌体 5.0 g/l 、エシエリヒア・コリ NM522/pGT3 株湿菌体 5
 0 g/l 、コリネバクテリウム・アジモニアゲナス ATCC21170 株湿菌体 1.50

g/1、オロツト酸(カリウム塩) 10g/1、グルコース 115g/1、ガラクトース 115g/1、 KH_2PO_4 15g/1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g/1、フイチン酸 5g/1、ナイミーンS-215 4g/1、キシレン 10ml/1の組成からなる反応液30mlを200ml容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900rpm)し、32℃で13時間反応を行った。

反応中4N NaOH を用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に5g/1のクロボトリオースが生成した。

産業上の利用可能性

本発明により、スクレオチドの前駆物質および糖のみを原料にして糖スクレオチドを、該糖スクレオチドおよび複合糖質前駆物質から複合糖質を工業的に効率よく製造できる。

配 列 表

31	<p>配列番号：1</p> <p>配列の長さ：31</p> <p>配列の型：核酸</p> <p>トポロジー：一本鎖</p> <p>配列の種類：他の核酸、合成 DNA</p> <p>配列</p> <p>GGAGAAAGCT TATGGCTGCC ATTAATACGA A</p>
30	<p>配列番号：2</p> <p>配列の長さ：30</p> <p>配列の型：核酸</p> <p>トポロジー：一本鎖</p> <p>配列の種類：他の核酸、合成 DNA</p> <p>配列</p> <p>AACACGGATC CGATGTTAC TTCTTAATGC</p>
28	<p>配列番号：3</p> <p>配列の長さ：28</p> <p>配列の型：核酸</p> <p>トポロジー：一本鎖</p> <p>配列の種類：他の核酸、合成 DNA</p> <p>配列</p> <p>ATGAGGATC CTGCTCTGTA TACCGTCT</p>
	<p>配列番号：4</p> <p>配列の長さ：20</p>

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TGCTGGTCCA CCTGCCCTTG

20

配列番号：5

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AAGAAAGCT TATGACGCAA TTAATCCCG T

31

配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GCAAGTTAA CAGTCGGTAC

20

配列番号：7

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列
TCAGGAAGCT TATGTTGAAT AATGCTATGA G 31

配列番号：8
配列の長さ：27
配列の型：核酸
トポロジー：一本鎖
配列の種類：他の核酸、合成 DNA
配列
TCTCCGATC CCATGTGACC GGGTTAG 27

配列番号：9
配列の長さ：28
配列の型：核酸
トポロジー：一本鎖
配列の種類：他の核酸、合成 DNA
配列
TCTAAATCGA TGCAGACAAA GGACAAAG 28

配列番号：10
配列の長さ：27
配列の型：核酸
トポロジー：一本鎖
配列の種類：他の核酸、合成 DNA
配列
TTGCAGGATC CTCGTAGGCC TGATAAG 27

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TGATATCCGC TCCTTTCCG

20

配列番号：12

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACAGCGGATC CGATGTGTTT CTTGAG

26

配列番号：13

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACAGCAAGCT TTGACTTTA GCGAGCAG

29

配列番号：14

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GAGTTGGATC CCGATATAAA AGGAAGGAT

29

配列番号：15

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTTTAAGCT TCATTATCA AGAGT

28

配列番号：16

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTTTGATAT CCCCAATGCT GGGGGTTTTT G

31

配列番号：17

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CGTCAAGCT TAATGATAT TCGGGGATAA T

31

配列番号：18

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AGGAGGATC CGACATTACT CGTTC

25

配列番号：19

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CCGCAAGATC TCGTAAAG GGTATCGATA AGC

33

配列番号：20

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTGGGAAGCT TCCGGCAAAAT GTGGTTT

27

配列番号：21

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ATAAAGCTCGA GAGAGACAAG CCGAG

25

配列番号：22

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TATATCGAT GAATTAAATAA TTCATAG

27

配列番号：23

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CTCTGCATCC AGTTACGTAT AATAT

25

配列番号：24

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CGGCAAGCTT ATTGTGCCTT TCCATAAATA

30

配列番号：25

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACTTGATCC CCGTCAATAA ATCTTGGC

28

配列番号：26

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GGTAAAGCTT ATGCAAAACC ACGTTATCAG

30

配列番号：27

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AAACGGATCC TTATTGGAAA GGCACAATA

29

請求の範囲

1. a) スクレオチドの前駆物質からスクレオチド-5'-一三リン酸(以下、NTPと略す)を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb) 糖とNTPからスクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、スクレオチドの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にスクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中からスクレオチドを採取することを特徴とするスクレオチドの製造法。

2. a) スクレオチドの前駆物質からスクレオチド-5'-一三リン酸(以下、NTPと略す)を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、b) 糖とNTPからスクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびc) 糖スクレオチドと複合糖質前駆物質からスクレオチドと複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、スクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆物質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

3. 糖スクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質前駆物質および請求項1記載の製造法により得られた糖スクレオチドを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

4. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩擦処理物、

請求項 1、2 または 3 記載の製造法。

[illegible]

7. カリジニニリノ酸化合物、グアノシニリノ酸化合物およびチジニ

8. 糖が、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ガラクトーシド、グルコサミン、N

ばれる糖である、請求項 1 または 2 記載の製造法。

N-アセチルガラクトサミン、グルクロン酸、マニトール、N-アセチルマニト
サミン、ブコース、シアル酸、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト
-N-ピコース、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、GlcNAc β 1-4
Gal β 1-4Glc、プロボトリオース、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc

[illegible]

を含む複合糖質または該複合糖質を含む複合糖質である、請求項2または3記載の製造法。

1 1. 複合糖質に含まれる糖が10個以下である、請求項9または10記載の方法。

1 2. 複合糖質に含まれる糖が6個以下である、請求項9または10記載の方法。

の方法。

13. 複合糖質前駆物質が、単糖、オリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、糖脂質、グリコペンチンおよびステロイド化合物から選ばれた複合糖質前駆物質である、請求項2または3記載の製造法。

14. 複合糖質前駆物質が、グルコース、ガラクトース、マンノース、シ

14. 複合糖質前駆物質が、グルコース、ガラクトース、マンノース、シ
アル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ラクトース、
N-アセチルラクトサミン、ラク ト-N-ビオース、GlcNAcβ1-3Gal
β1-4Glc、GlcNAcβ1-4Galβ1-4Glc、グロボトリオース、G
alα1-4Galβ1-4GlcNAc、2'-7コシルラク トース、3'-7コシルラク
トース、3'-シアリルラク トース、6'-シアリルラク トース、3'-シアリル-N-ア
セチルラク トサミン、6'-シアリル-N-アセチルラク トサミン、シアリルラク
ト-N-ビオース、ルイSX、ルイSa、ラク ト-N-アセチルラク トー
N-ネオテトラオース、ラク トジワコテトラオース、3'-シアリル-3-7コシルラ
ク トース、シアリルルイSX、シアリルルイSa、ラク ト-N-アセチルラク トー
スI、ラク ト-N-アセチルラク トーII、ラク ト-N-アセチルラク トーIII、ラ
ク ト-N-アセチルラク トーIV、LS-アセチルラク トーVa、LS-アセチルラク
トーVb、LS-アセチルラク トーFc、(a2, 3) シアリルラク トーN-ネオテ

トラオースおよびこれらの誘導体、セリン、スレニ、アスパラギンおよび該アミノ酸を含有するペプチドおよびその誘導体、セラミドおよびその誘導体から選ばれる複合糖質前駆物質または該複合糖質前駆物質を含む複合糖質前駆物質である、請求項 13 記載の製造法。

15. スクレスチドの前駆物質から NTP を生産する能力を有する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

16. コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アノモニアゲナスであることを特徴とする請求項 15 記載の製造法。

17. 糖と NTP から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、1 種類ないしそれ以上の微生物より構成されることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

18. 微生物が、エシエリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる 1 種類ないしそれ以上の微生物であることを特徴とする、請求項 17 記載の製造法

19. エシエリヒア属に属する微生物がエシエリヒア・コリである、請求項 18 記載の製造法。

20. コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アノモニアゲナスである、請求項 18 記載の製造法。

21. 糖と NTP から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ (以下、g1k と略す)、ホスホグルコムターゼ (以下、p gm と略す)、グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (以下、g a 1 と略す)、グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (以下、p p a と略す) およびピロフオスフターゼ (以下、p p a と略す) から選ばれる 1 つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

22. 微生物が、g 1 k をコードする遺伝子、p g m をコードする遺伝子、g a 1 u をコードする遺伝子および p p a をコードする遺伝子から選ばれる 1 種

類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項21記載の製造法。

23. g1kをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、ga1uをコードする遺伝子およびpdaをコードする遺伝子が、エシエリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項22記載の製造法。

24. 糖ヌクレオチドがウリジニリン酸グルコースである、請求項21記載の製造法。

25. 微生物がウリジニリン酸グルコースデヒドロゲナーゼ活性の強い微生物であり、糖ヌクレオチドがウリジニリン酸グルクロン酸である、請求項21記載の製造法。

26. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ガラクトキナーゼ（以下、ga1kと略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

27. 請求項26記載のga1k活性の強い微生物により、N-アセチルグルコサミンを基質にしてN-アセチルグルコサミン-1-リン酸が供給されることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

28. 微生物が、ga1kをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

29. ga1kをコードする遺伝子がエシエリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項28記載の製造法。

30. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ガラクト-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、ga1tと略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

31. 微生物が、ga1tをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項30記載の製造法。

32. g a l T をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項 31 記載の製造法。

33. 糖と N T P から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ (以下、g l k と略す)、ホスホグルコムターゼ (以下、p g m と略す)、グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (以下、g a l と略す) およびピロワスフターゼ (以下、p p a と略す) から選ばれる 1 つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 30 記載の製造法。

34. 微生物が、g l k をコードする遺伝子、p g m をコードする遺伝子、g a l U をコードする遺伝子および p p a をコードする遺伝子から選ばれる 1 種類以上の遺伝子を含む D N A 断片とベクターとの組換え体 D N A を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 33 記載の製造法。

35. g l k をコードする遺伝子、p g m をコードする遺伝子、g a l U をコードする遺伝子および p p a をコードする遺伝子エシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項 34 記載の製造法。

36. 糖ヌクレオチドがウリジニリン酸ガラクトースである、請求項 30 または 33 記載の製造法。

37. 糖と N T P から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (以下、g l m U と略す) 活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 26 記載の製造法。

38. 微生物が、g l m U をコードする遺伝子を含む D N A 断片とベクターとの組換え体 D N A を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 37 記載の製造法。

39. g l m U をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項 38 記載の製造法。

40. 糖と N T P から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、

ホスホグルコムターゼ (以下 p g m と略す) およびホスホフルクトキナーゼ (以下 p f k B と略す) 活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

4 1. 微生物が、p g m をコードする遺伝子、p f k B をコードする遺伝子から選ばれる 1 種類以上の遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 2. p g m をコードする遺伝子、p f k B をコードする遺伝子がエシエ

リヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項 4 1 記載の製造法。

4 3. 請求項 4 0 記載の p g m および p f k B 活性の強い微生物により、

グルコース-6-リン酸およびフルクトース-6-リン酸を基質にして、グルコース-1, 6-二リン酸が供給されることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 4. 請求項 4 3 記載の方法により供給されたグルコース-1, 6-二リン酸により、ホスホグルコムターゼまたはホスホフリンコムターゼ活性が増

強されることを特徴とする、請求項 4 3 記載の製造法。

4 5. 糖と N T P から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、

グルコムサミシ-1-リン酸アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコムサミシ-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (以下、g l m U と略す)、ピロフオスフターゼ (以下、p a と略す)、ホスホグルコムサミシムターゼ (以下、g l m M と略す)、グルコキナーゼ (以下、g l k と略す) から選ばれる 1 つ以上

の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 6. 微生物が、g l m U をコードする遺伝子、p a をコードする遺伝子、g l m M をコードする遺伝子および g l k をコードする遺伝子から選ばれる

1 種類以上の遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 4 5 記載の製造法。

4 7. g l m U をコードする遺伝子、p a をコードする遺伝子、g l m

Mをコードする遺伝子およびg 1 kをコードする遺伝子がエシェリヒ・コリ山
来の遺伝子であることを特徴とする、請求項4 6記載の製造法。

4 8. 糖ヌクレオチドがウリジニリン酸-N-アセチルグルコサミンで
ある、請求項2 6、3 7、4 0または4 5記載の製造法。

4 9. 微生物がUDP-G 1 c N A c 4-エピメラゼ活性の強い微生物
であり、糖ヌクレオチドがウリジニリン酸-N-アセチルガラクトサミンであ
る、請求項2 6、3 7、4 0または4 5記載の製造法。

5 0. 糖とN T Pから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、
ホスホペンノムターゼ（以下、m a n Bと略す）、ペンノース-1-リン酸グア
ニルトランスフェラーゼ（以下、m a n Cと略す）、グルコキナーゼ（以下、g
1 kと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴
とする、請求項4 0記載の製造法。

5 1. 微生物が、m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺
伝子、g 1 kをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むD N A
断片とベクターとの組換え体D N Aを保有する1種類以上の微生物から構成され
ることを特徴とする、請求項5 0記載の製造法。

5 2. m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺伝子、g 1
kをコードする遺伝子がエシェリヒ・コリ由来の遺伝子であることを特徴とす
る、請求項5 1記載の製造法。

5 3. 糖ヌクレオチドがグアノシニリン酸ペンノースである、請求項4
0または5 0記載の製造法。

5 4. 糖とN T Pから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、
ホスホペンノムターゼ（以下、m a n Bと略す）、ペンノース-1-リン酸グア
ニルトランスフェラーゼ（以下、m a n Cと略す）、グルコキナーゼ（以下、g
1 kと略す）、G D P-4, 6-ペンノースフェリトラターゼ（以下、g m dと略
す）およびG D P-4-クト-6-デオキシペンノースエピメラゼ/レタウ
ターゼ（以下、w c a Gと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物

物であることを特徴とする、請求項40記載の製造法。

55. 微生物が、 $manB$ をコードする遺伝子、 $manC$ をコードする遺伝子、 $g1k$ をコードする遺伝子、 gmd をコードする遺伝子および $wcag$ をコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項54記載の製造法。

56. $manB$ をコードする遺伝子、 $manC$ をコードする遺伝子、 $g1k$ をコードする遺伝子、 gmd をコードする遺伝子および $wcag$ をコードする遺伝子がエシェリヒ・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項55記載の製造法。

57. 糖ヌクレオチドがグアノシリン酸ワコースである、請求項40または54記載の製造法。

58. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、 $G1cNAc$ 、2-エピメラゼ、CMP-N-eucシンセターゼ（以下、 n eucAと略す）、 N eucアルブラーゼ（以下、 $nanA$ と略す）、 N eucシンセターゼ（以下、 n eubと略す）およびCTPシンセターゼ（以下、 p yrGと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

59. 微生物が、 $G1cNAc$ 、2-エピメラゼをコードする遺伝子、 n eucAをコードする遺伝子、 $nanA$ をコードする遺伝子、 n eubをコードする遺伝子および p yrGをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項58記載の製造法。

60. n eucAをコードする遺伝子、 $nanA$ をコードする遺伝子、 n eubをコードする遺伝子および p yrGをコードする遺伝子がエシェリヒ・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項59記載の製造法。

61. 糖ヌクレオチドがシチジニリン酸-N-アセチルノイラミン酸で

ある、請求項 5 8 記載の製造法。

6 2. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物が、エシエリヒア・コリまたはサウカロマイセス・セレビシエまたはコリネバクテリウム・アノモニアゲナスであることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の製造法。

6 3. 微生物が、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、ラクトサミンニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれた少なくとも一種の組換え体 DNA を保有する微生物であることを特徴とする、請求項 6 2 記載の製造法。

6 4. グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、ラクトサミンニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれた少なくとも一種の組換え体 DNA を保有する微生物由来であることを特徴とする、請求項 6 3 記載の製造法。

6 5. 動物細胞が、COS-7 細胞またはバブバ K J M-1 細胞であり、昆虫細胞が Sf 9 細胞であることを特徴とする、請求項 2 または 3 記載の製造法。

6 6. 動物細胞あるいは昆虫細胞が、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、ラクトサミンニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれた少なくとも一種の組換え体 DNA を保有する動物細胞あるいは昆虫細胞であることを特徴とする、請求項 2 または 3 記載の製造法。

67. グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、
 N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニ
 ルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランス
 フェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ
 から選ばれるトランスフェラーゼをコードする遺伝子が動物細胞由来であること
 を特徴とする、請求項6記載の製造法。

68. 請求項26記載のgalK活性の強い微生物の培養液または該培養
 液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびN-アセチルグルコサミンを水
 性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にN-アセチルグルコサミン-1-リン酸
 を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を採
 取することを特徴とするN-アセチルグルコサミン-1-リン酸の製造法。

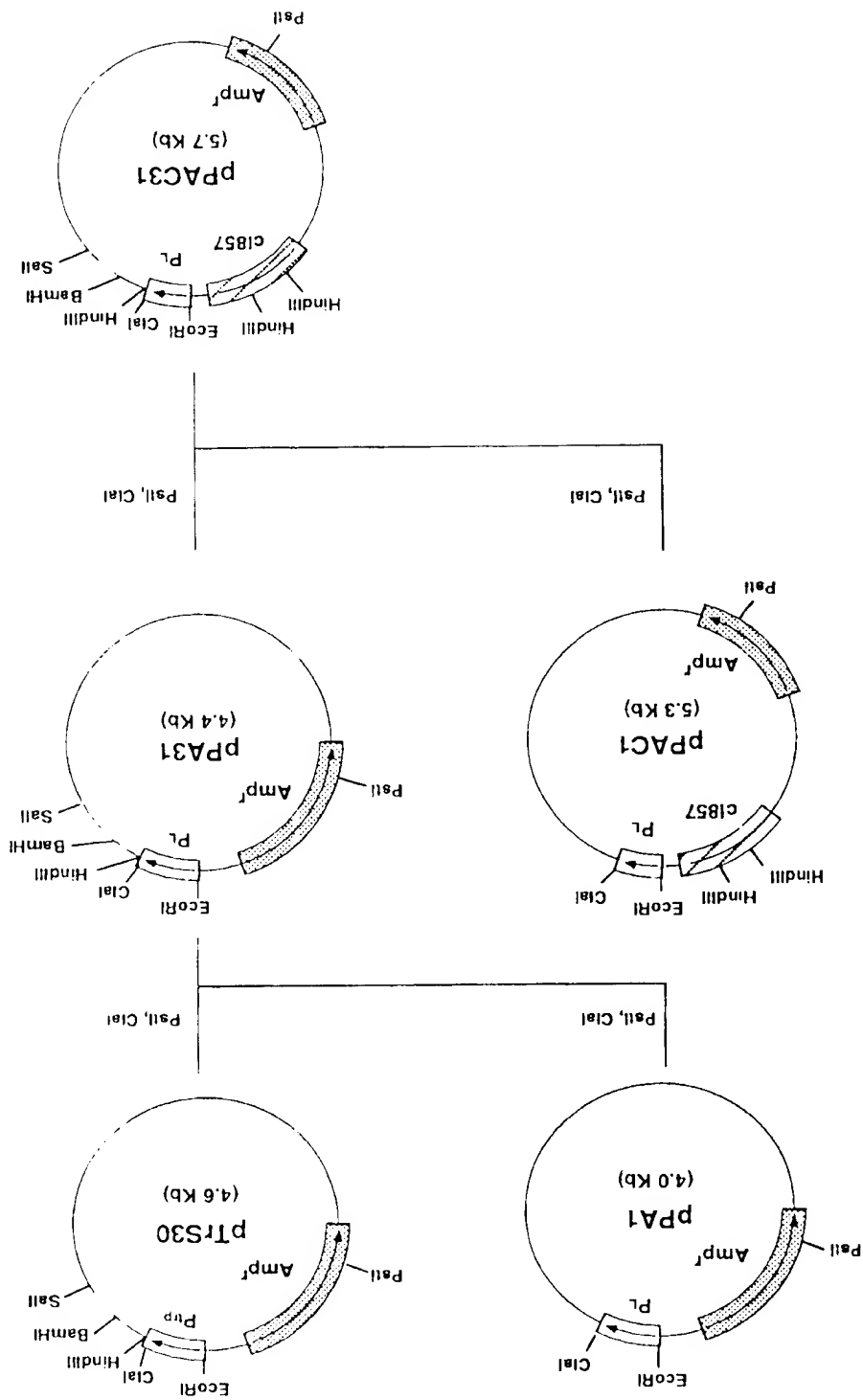
69. 微生物が、galKをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクタ
 トキナーゼをコードする遺伝子である、請求項69記載の製造法。

71. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を

遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵
 素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾
 燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕
 処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該
 細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品であることを特徴
 とする、請求項68記載の製造法。

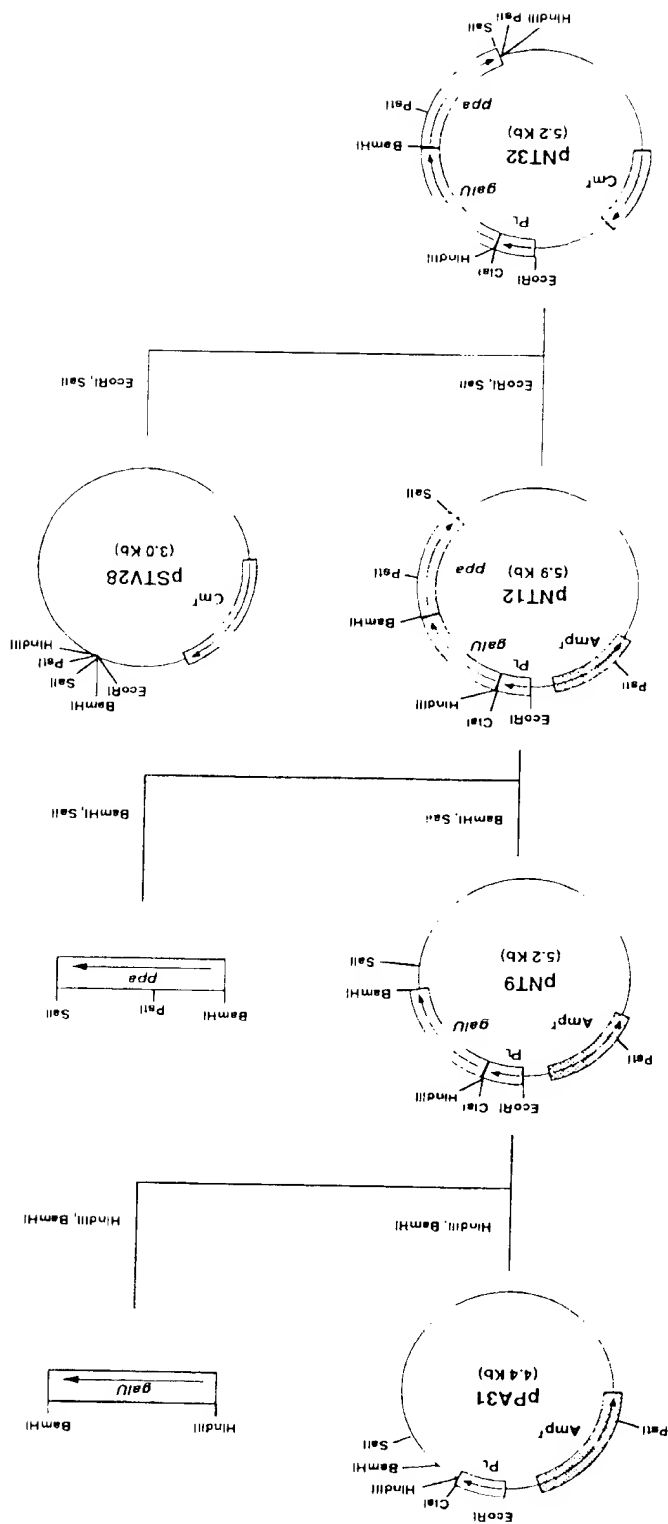


第 1 図



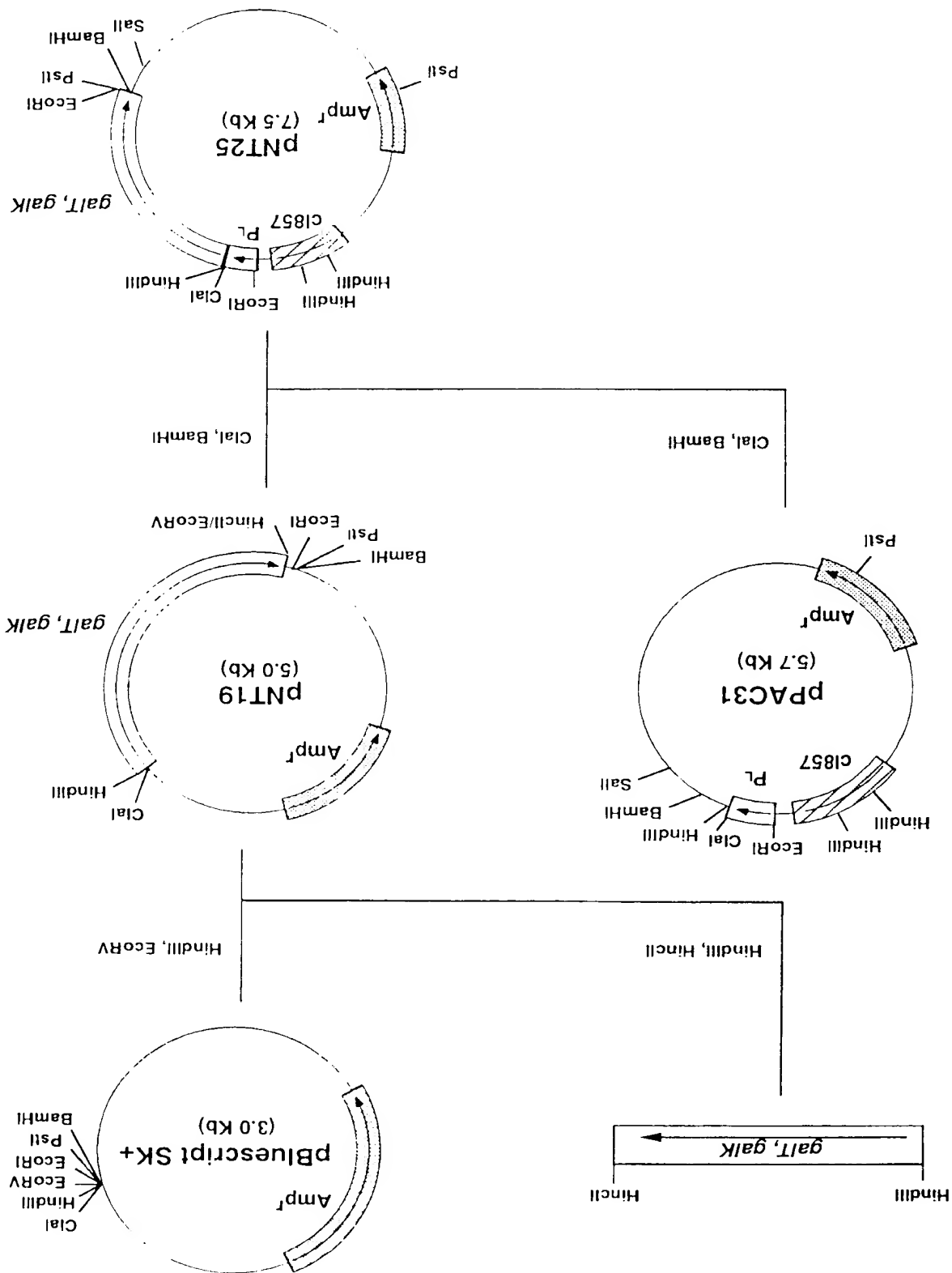


第 2 図

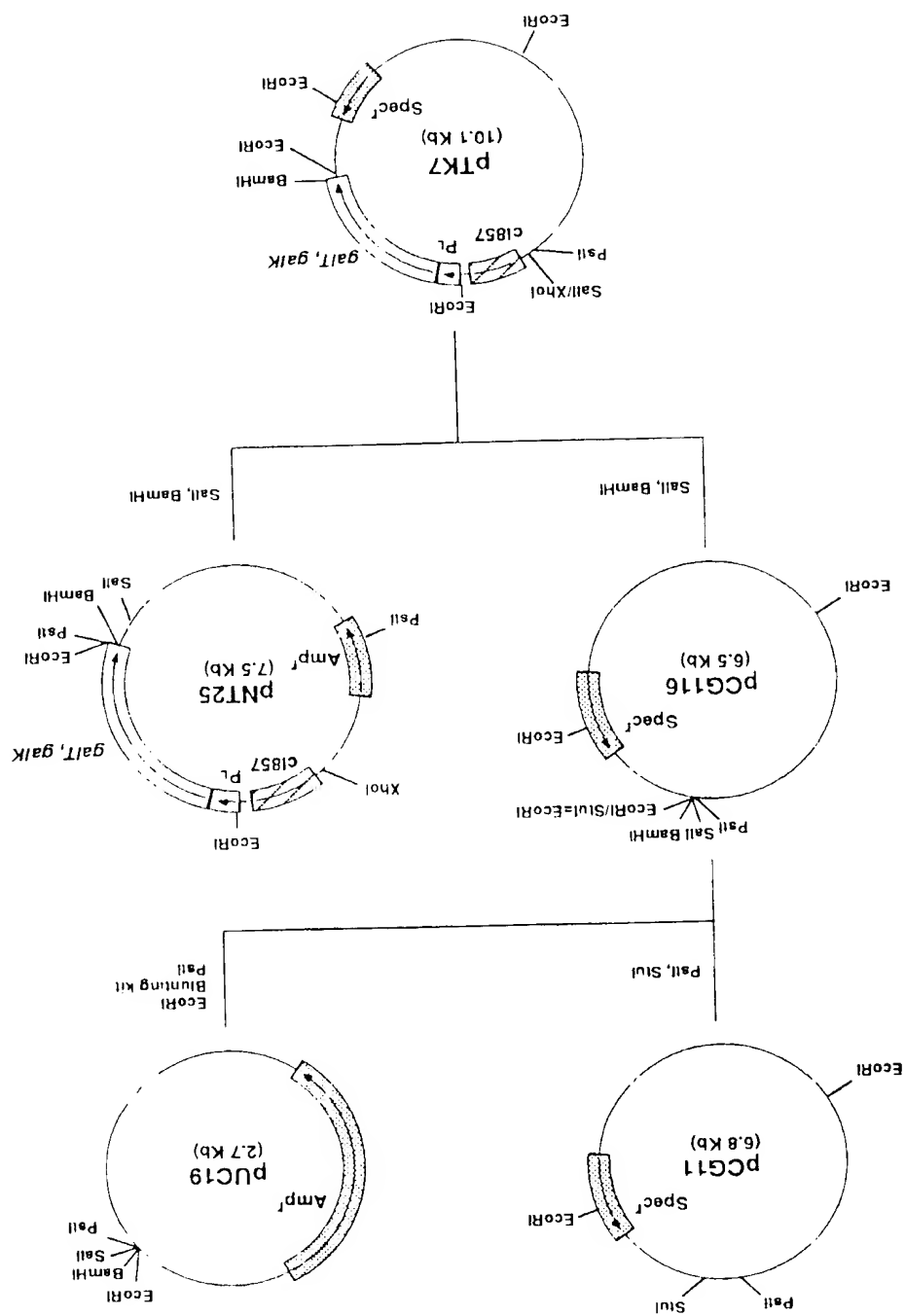




第 3 図

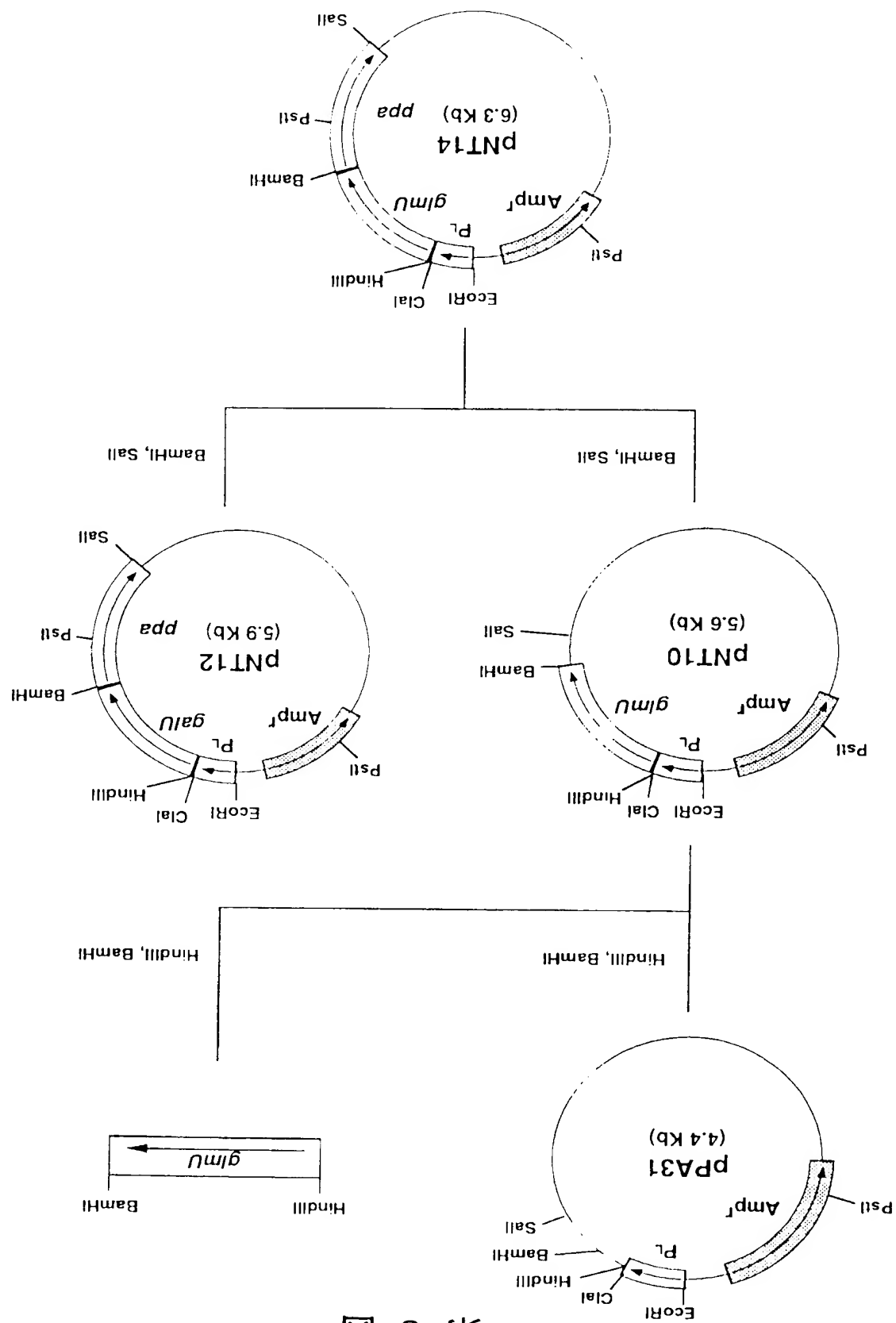




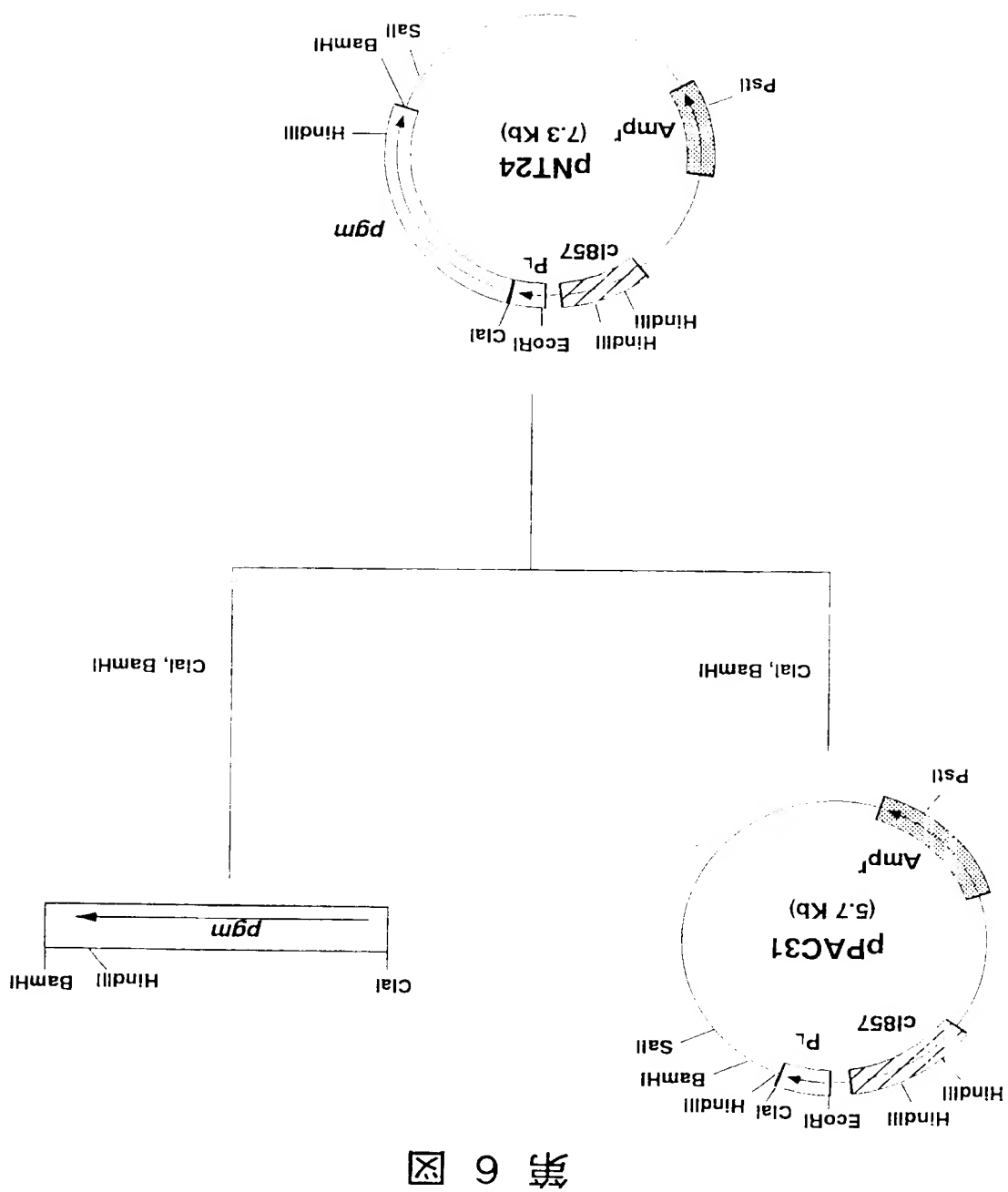




第 5 図

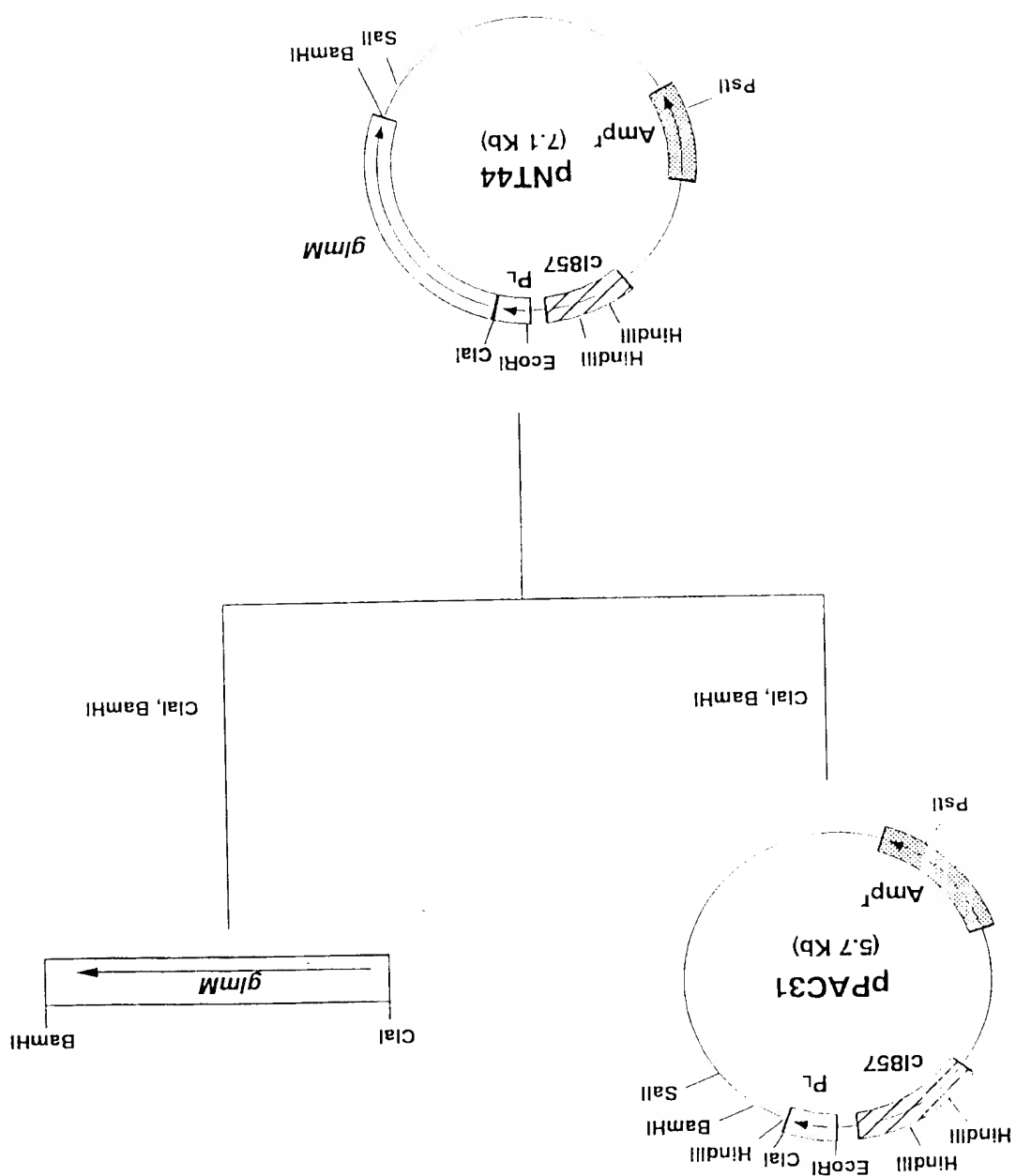






第 6 図

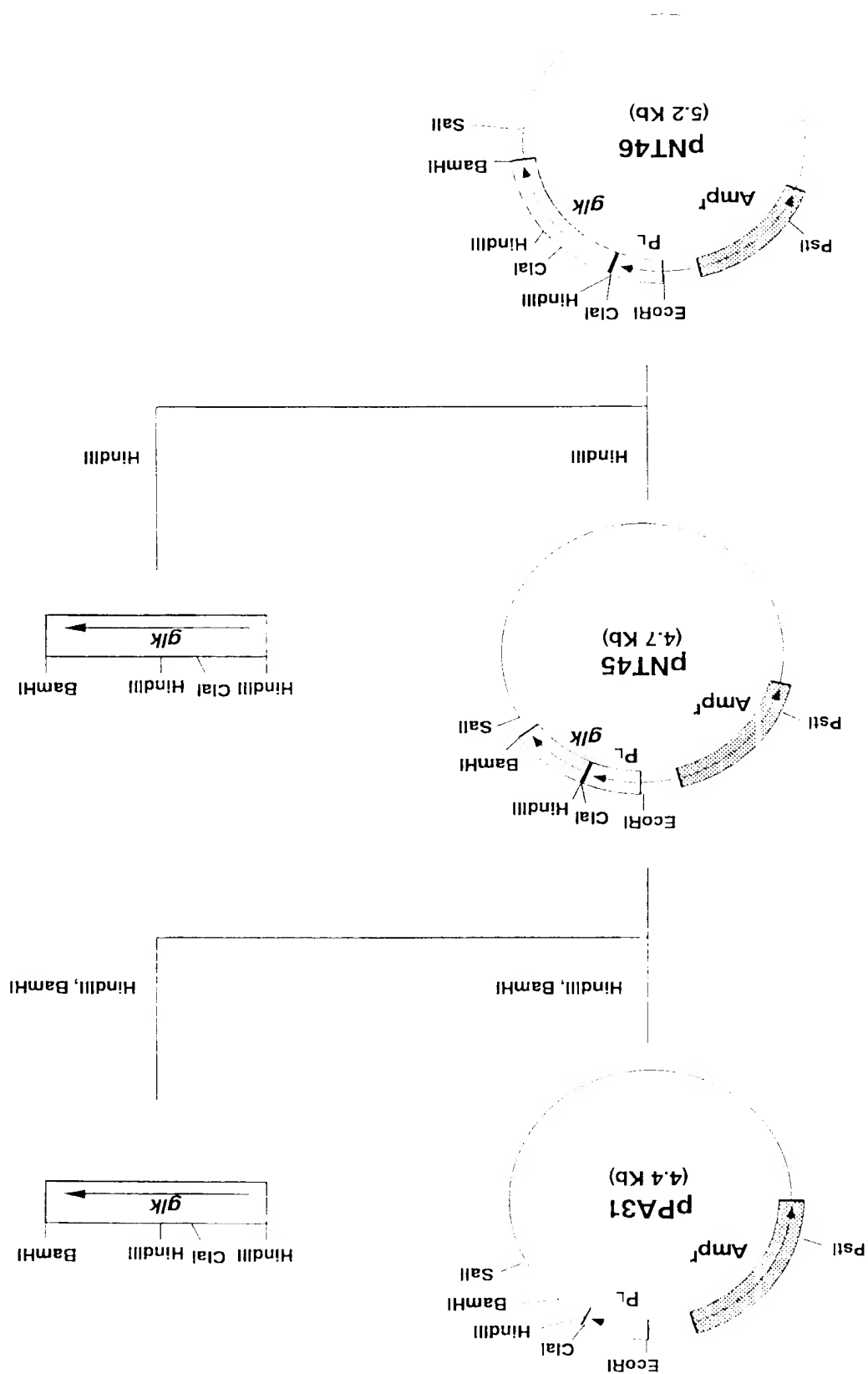




第 7 図

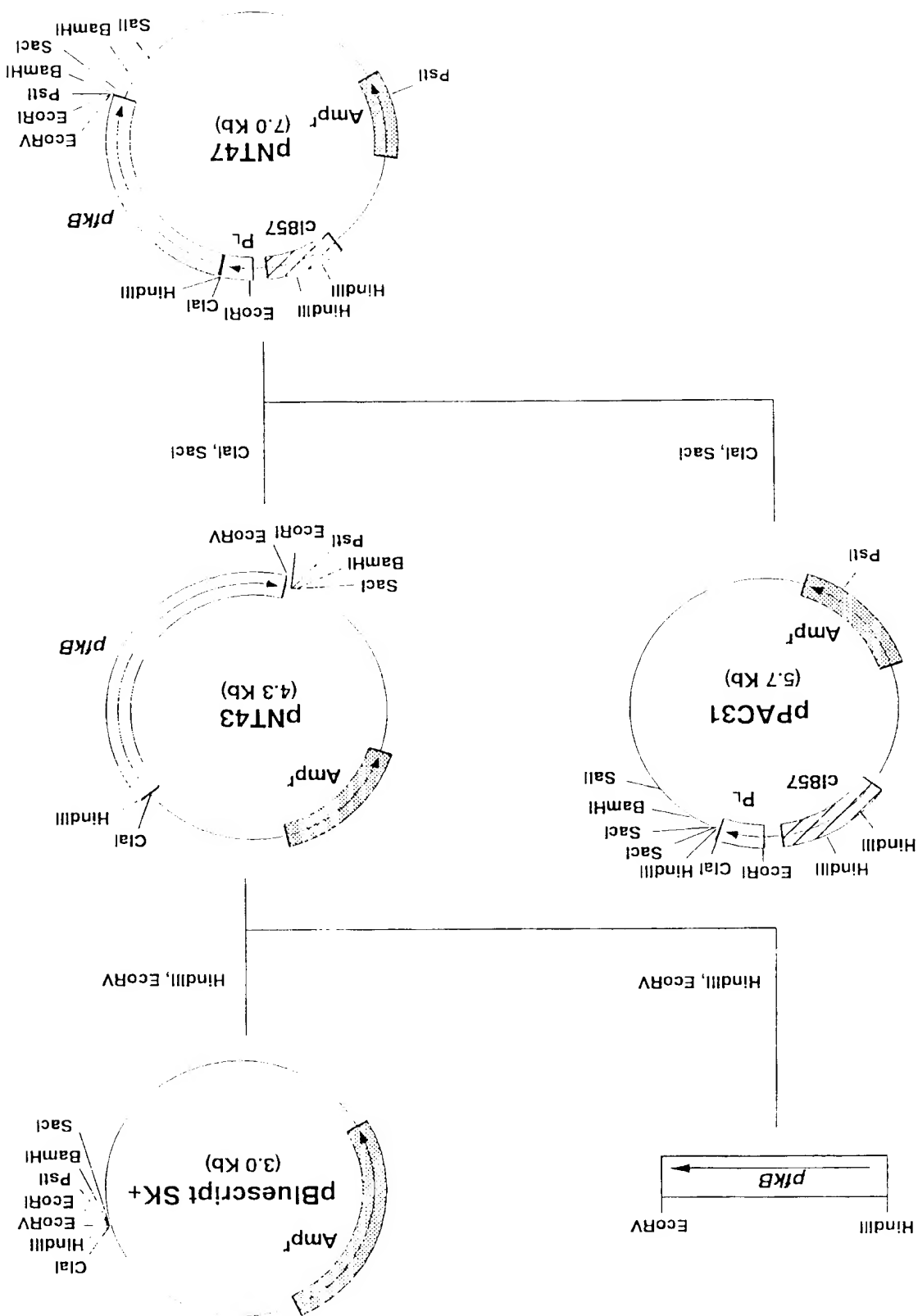


第 8 図



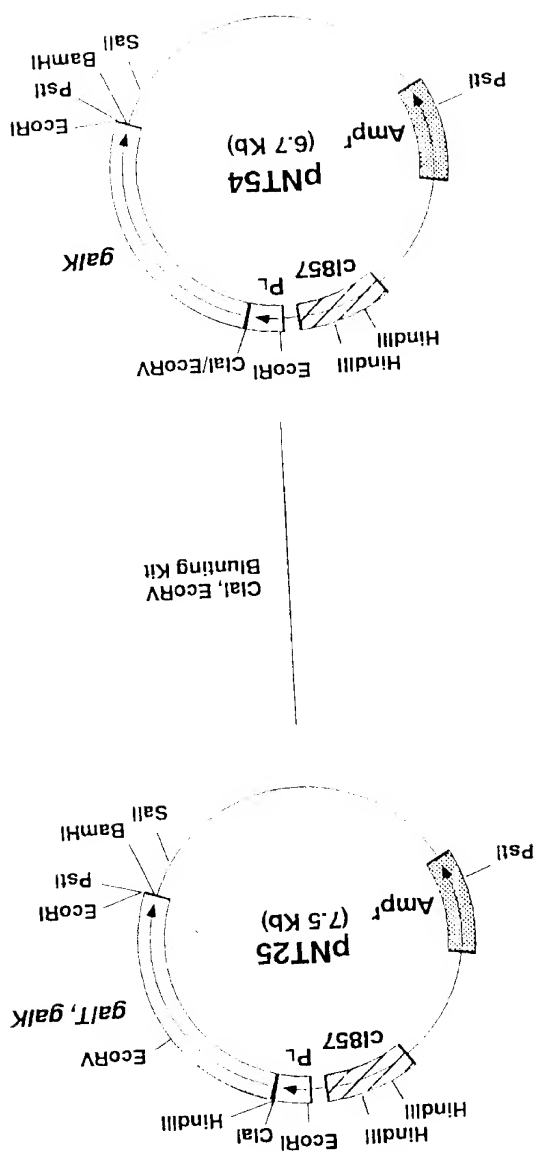


第 9 図



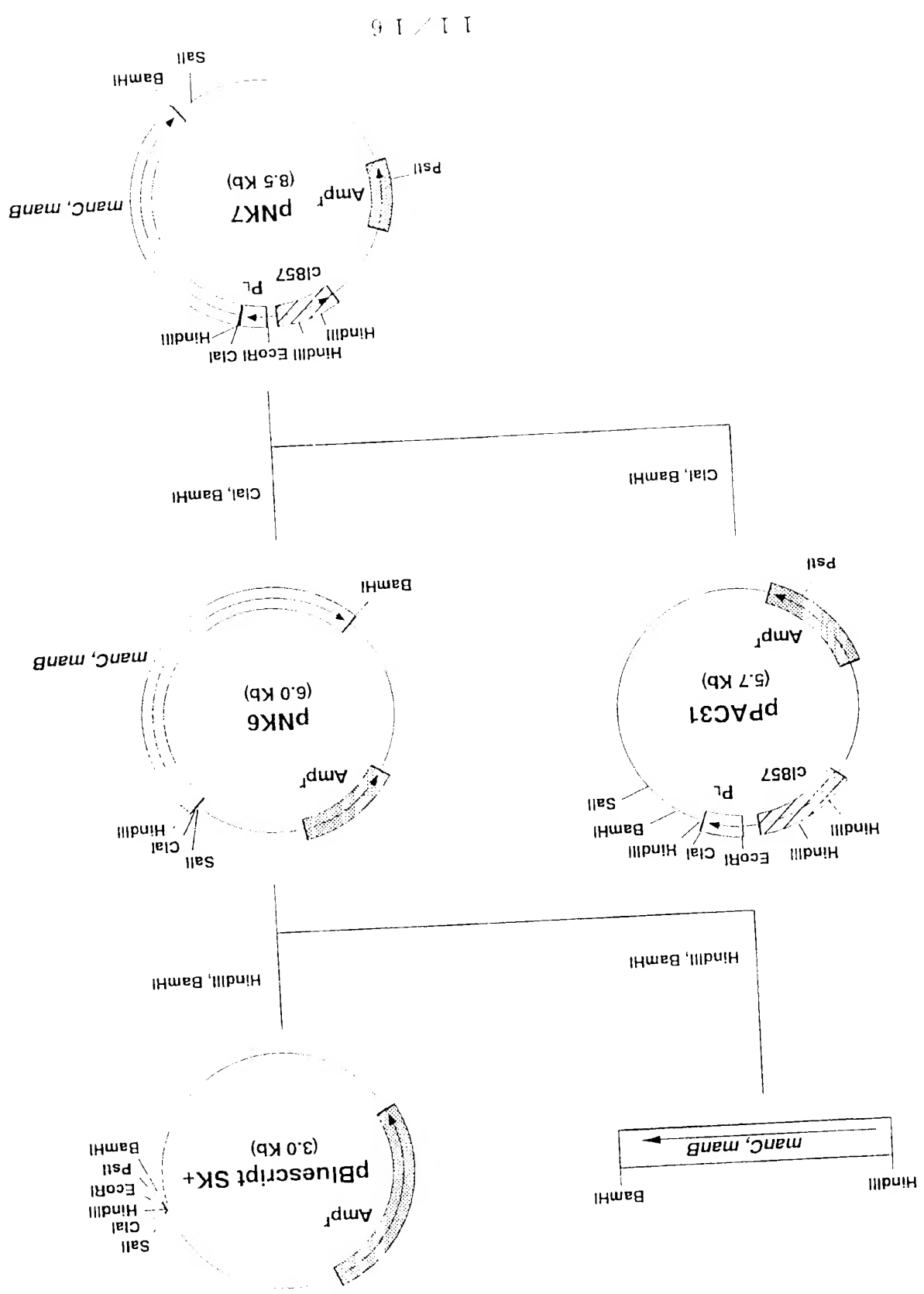


第 10 図





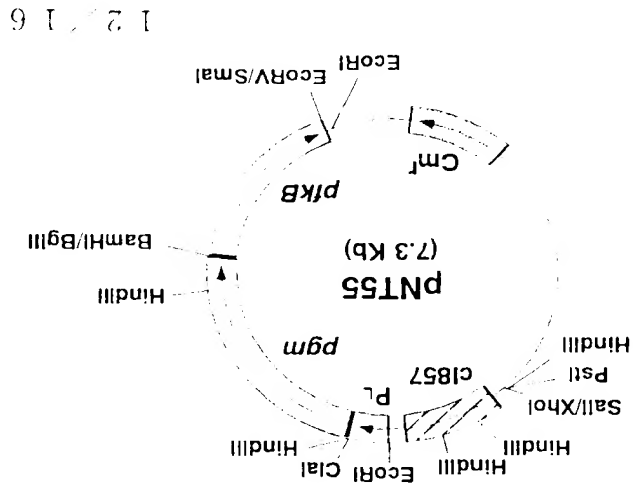
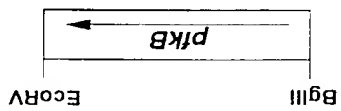
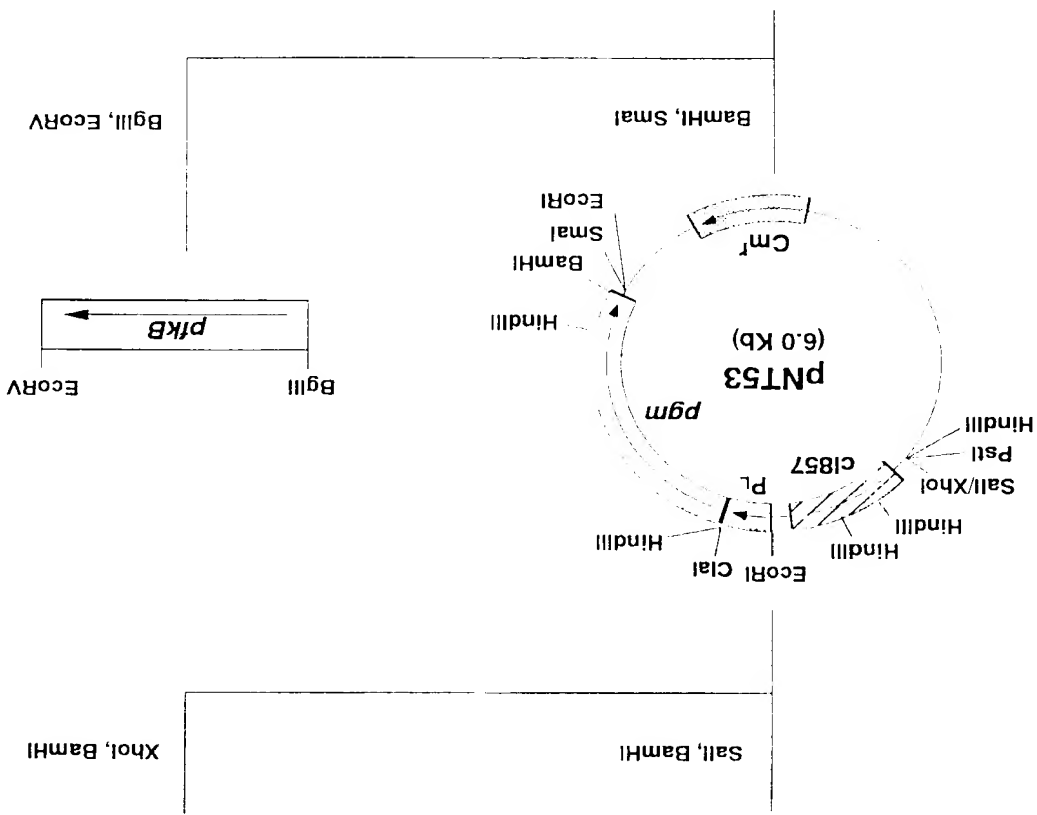
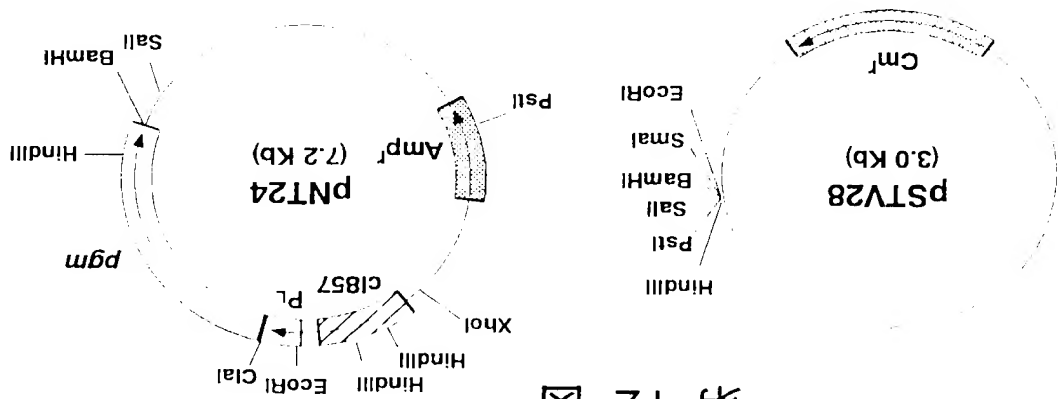
第 11 図



11/16

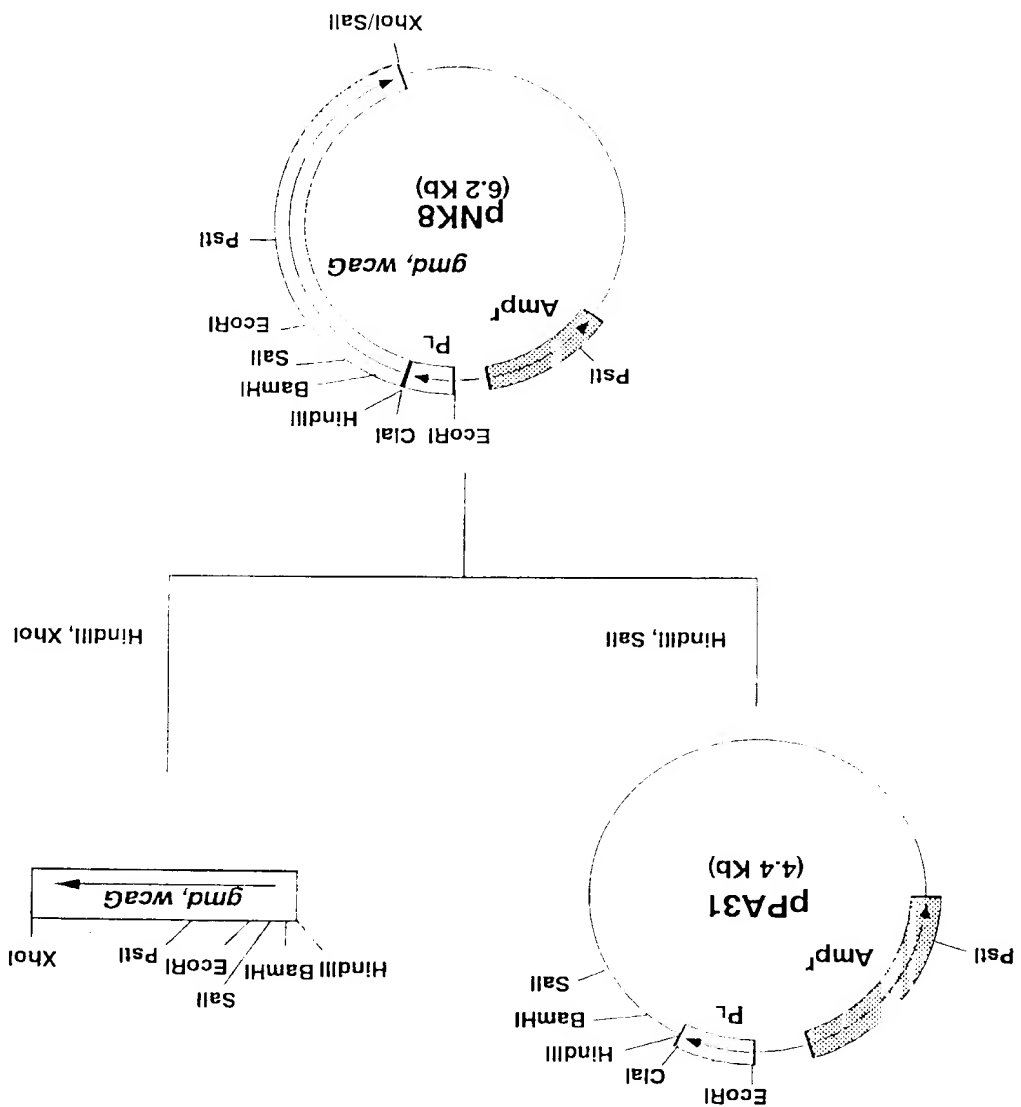


第 12 図

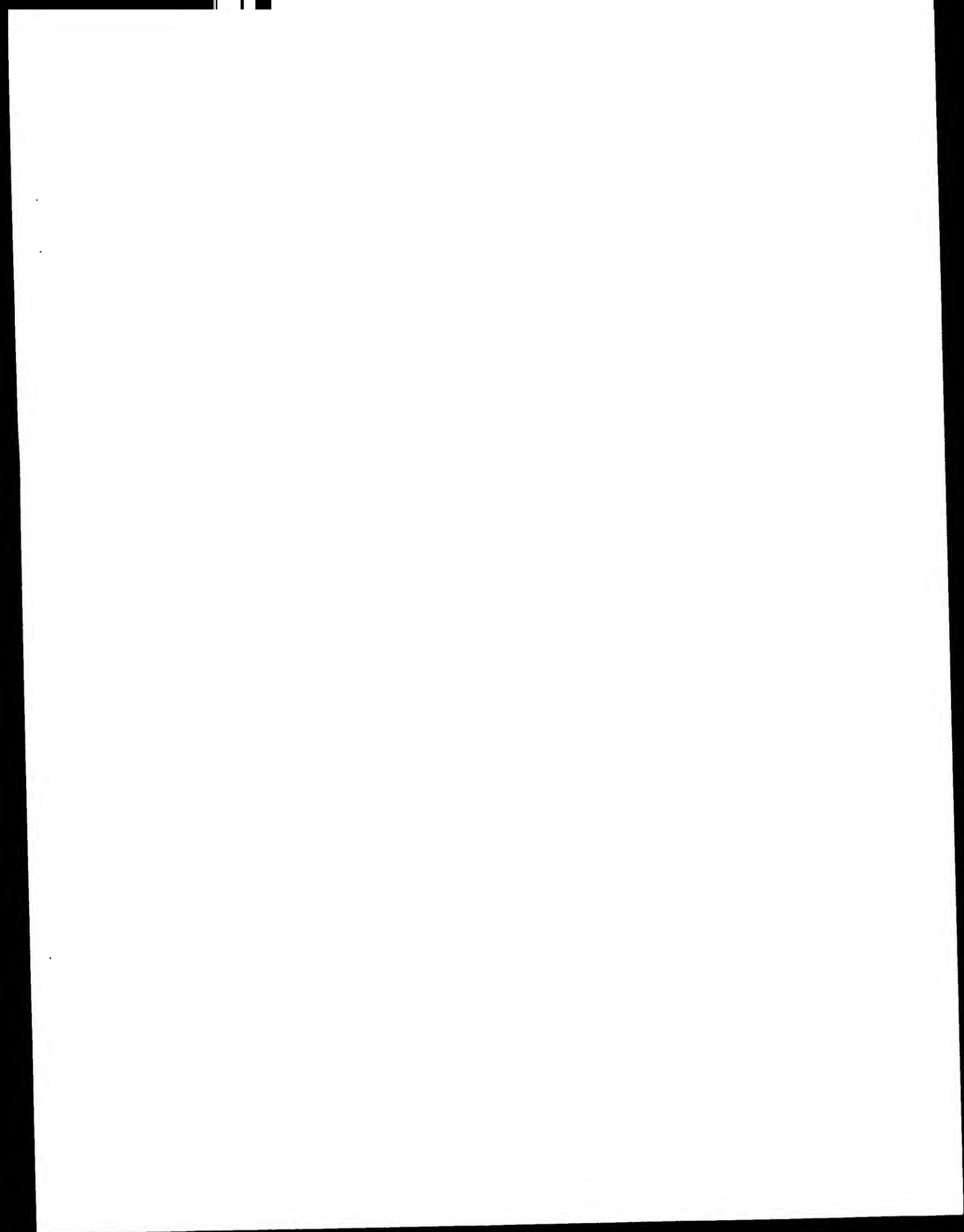


12/16

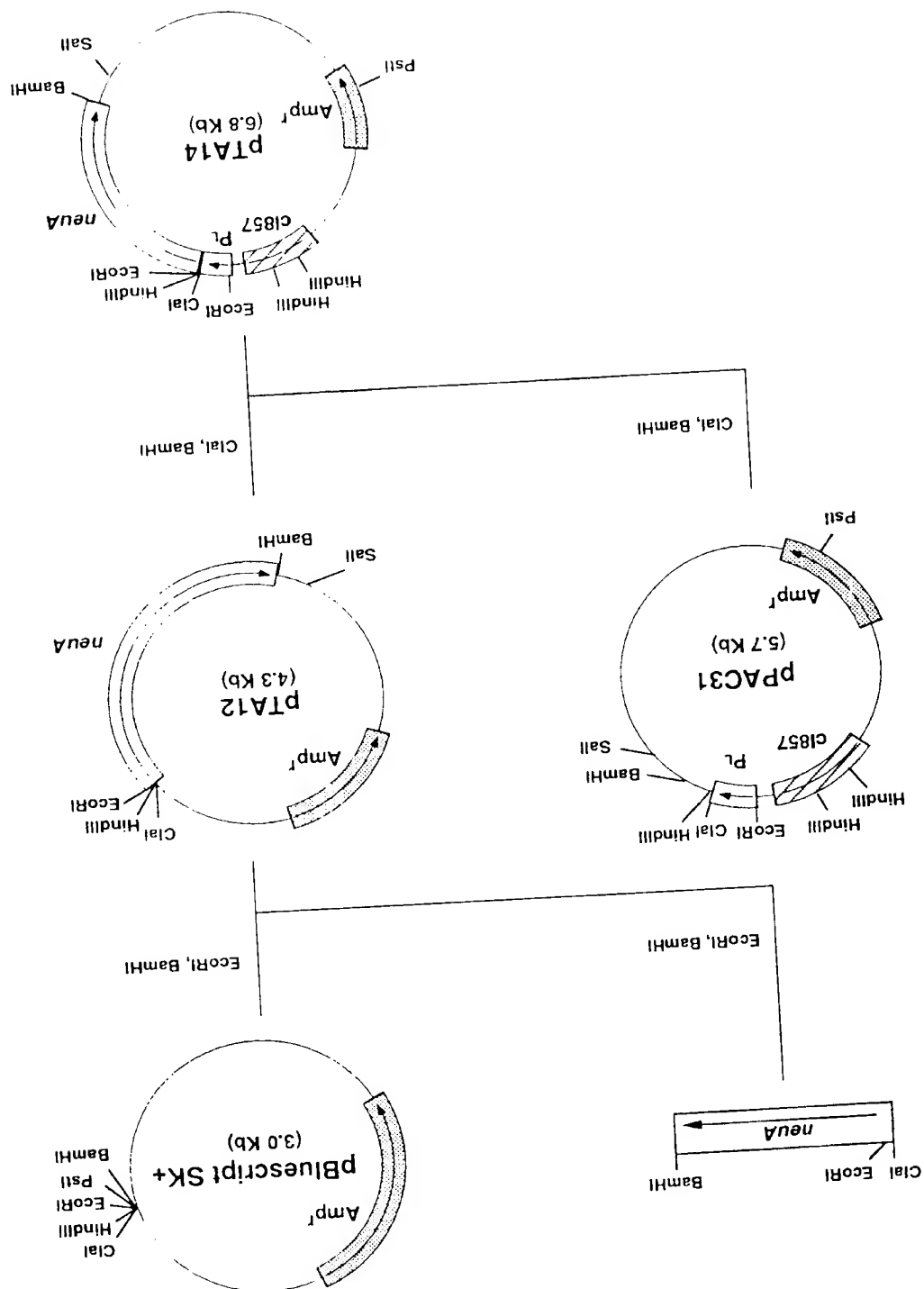




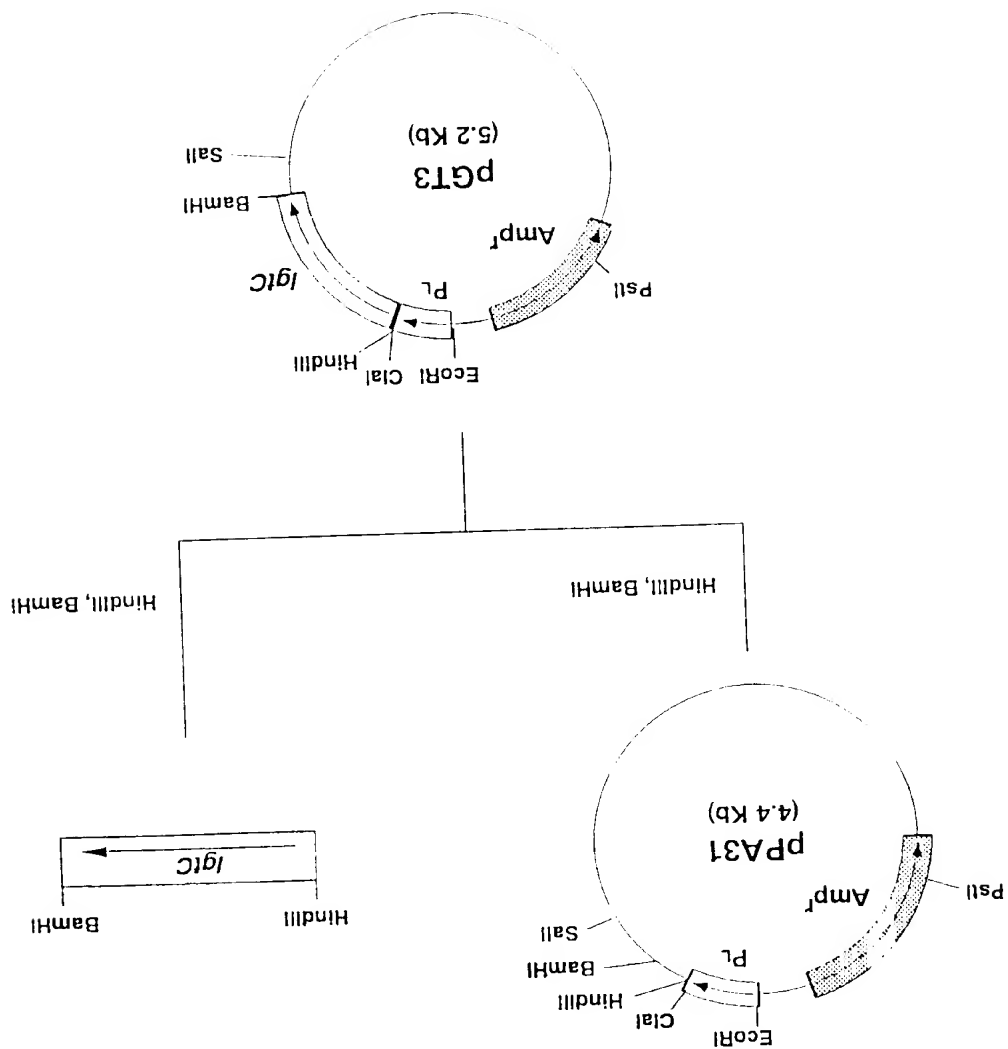
第 13 図



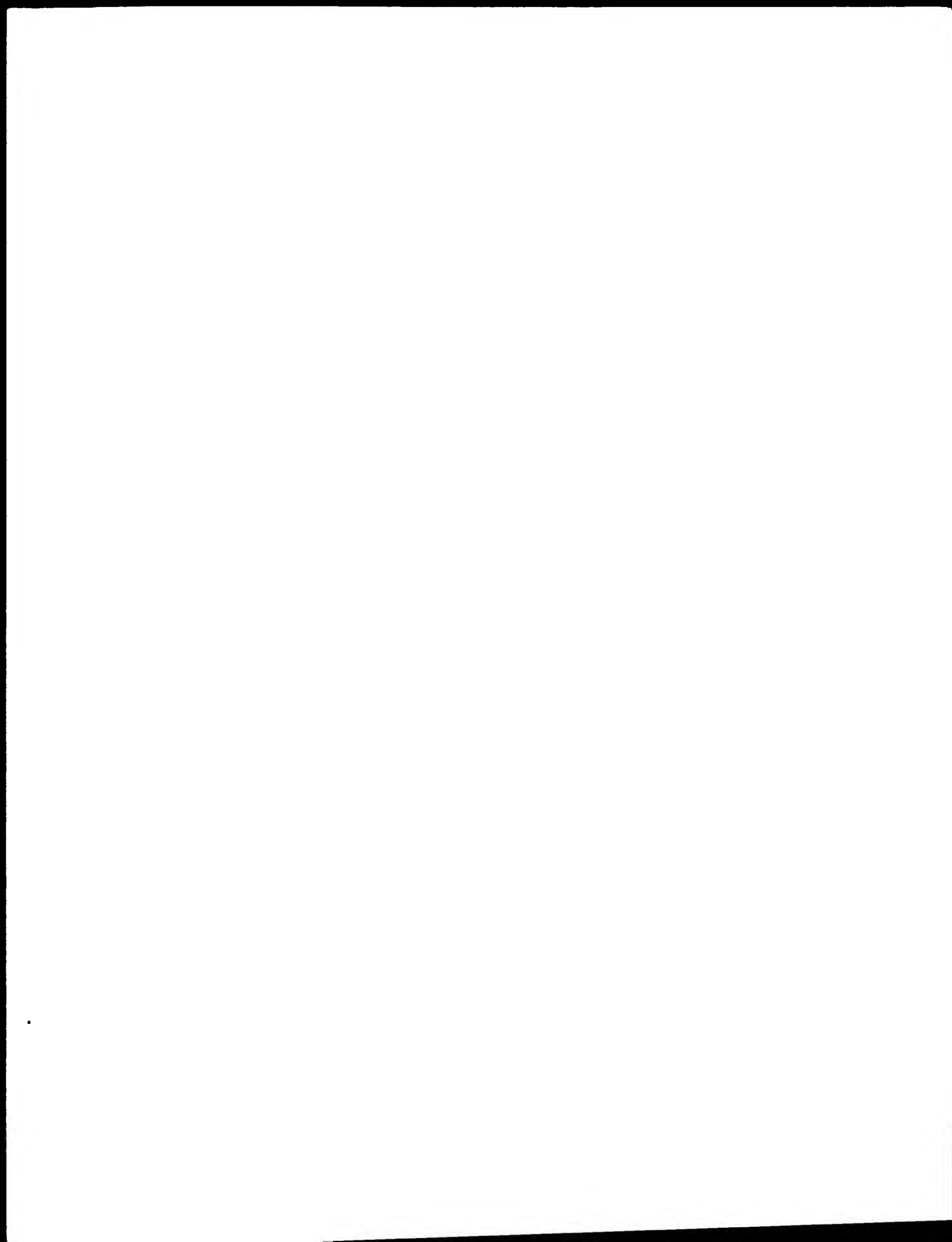
第 14 図



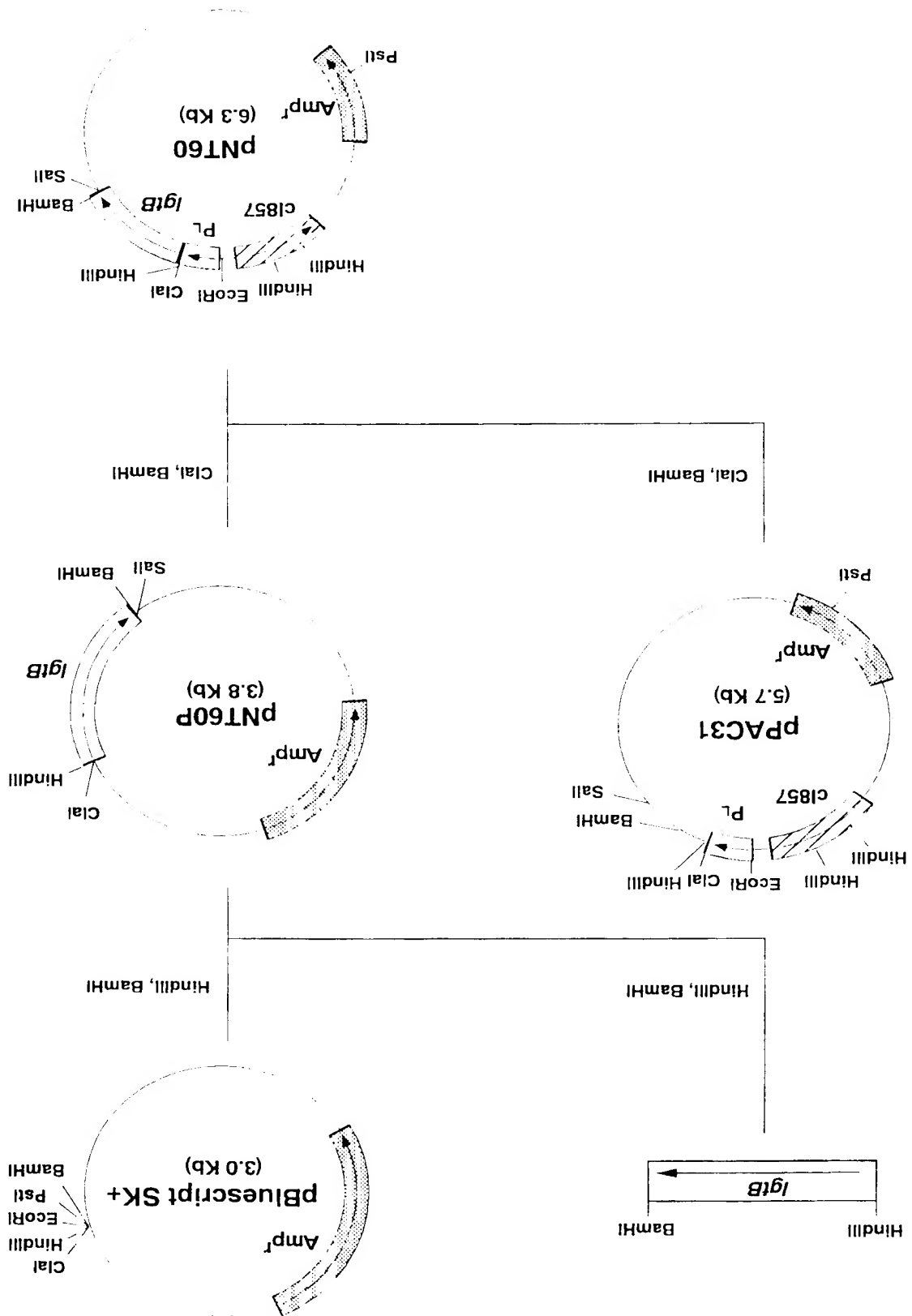




第 15 図



第 16 図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/03226A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl.⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16 // (C12P19/26,
C12R1:19, C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl.⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 47-1837, BI (Koichi Ogata), January 19, 1972 (19. 01. 72) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X	JP, 46-40756, BI (Koichi Ogata), December 1, 1971 (01. 12. 71) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X	JP, 62-134096, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), June 17, 1987 (17. 06. 87) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X	JP, 47-46351, BI (Marukin Shoyu Co., Ltd.), November 22, 1972 (22. 11. 72) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X	JP, 57-18893, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), January 30, 1982 (30. 01. 82) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X	JP, 7-233187, A (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), September 5, 1995 (05. 09. 95) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "E" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
December 11, 1997 (11. 12. 97)

Date of mailing of the international search report
January 13, 1998 (13. 01. 98)

Authorized officer

Telephone No.

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Facsimile No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.), March 1, 1989 (01. 03. 89) & WO, 87/05937, A & NO, 179875, B & EP, 380470, B	15 - 61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/032226

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 The common matter in Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61 is a process for producing sugar nucleotides as set forth in Claim 1.
 However, the search conducted has revealed that these processes are not novel ones but the ones disclosed in Reference 1 (JP, 47-1837, B (Koichi Ogata) Jan. 1, 1972 (19. 01. 72)), Reference 2 (JP, 46-40756, B (Koichi Ogata), Dec. 1, 1971 (01. 12. 71)) and Reference 3 (JP, 62-134096, A, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), June 17, 1987 (17. 06. 87)). (The enzyme source described in Claim 1, i.e., a culture of a microorganism, includes cells obtained by centrifuging the culture and an enzymatic preparation obtained by all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/032226

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

extracting these cells after being mechanically disrupted, as described in claim 4. It is stated in the references that the enzyme sources usable in References 1 and 2 and the microorganisms cultures containing the cells, but also disrupted cells, cell extracts, etc. Thus, the enzyme source as described in claim 1 corresponds to the enzyme sources in References 1 and 2 and the microorganisms in Reference 3. Accordingly, there is no difference among them.)

Consequently, the process for producing sugar nucleotides as claimed in claim 1 does not lie outside the category of the prior art and, therefore, the common matter (the invention of claim 1) is not a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT.

Therefore, there is no common matter in claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61. Since there is no common feature regarded as a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT, these inventions differing from each other are not technically linked to each other under the provisions of Rule 13 of the Regulations under the PCT. Such being the case, the inventions of claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61 do not comply with the requirement of unity of invention.

国際調査報告 国際出願番号 PCT/JP97/03226

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5, 16//
(C12P19/26, C12R1:19, C12R1:15)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5, 16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリ*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

請求の範囲の番号
関連する

X

J P, 47-1837, B1 (緒方浩一)
19. 1月. 1972 (19. 01. 72)
(ファミリーなし)

Y

J P, 46-40756, B1 (緒方浩一)
1. 12月. 1971 (01. 12. 71)
(ファミリーなし)

X

J P, 62-134096, A (雪印乳業株式会社)
17. 6月. 1987 (17. 06. 87)
(ファミリーなし)

Y

1, 4-8
2-3, 9-61

1, 4-8
2-3, 9-61

1, 4-8
2-3, 9-61

☒

C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐

ファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行

日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

国際調査を完了した日

11. 12. 97

国際調査報告の発送日

13.01.98

国際調査機関の名称及びびあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 倫子



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

二 (終号) .

* — 11 — *

請求の範囲の番号

J P, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.)

J P, 7-233187, A (扶桑薬品工業株式会社)
5. 9月. 1995 (05. 09. 95)

J.P., 57-18893, A (旭化成工業株式会社) 30. 1月. 1982 (30. 01. 82)

J.F., 47-46351, B1 (丸金醤油株式会社) 22. 11月. 1972 (22. 11. 72)

&WO, 87/05937, A
&NO, 179875, B
&EP, 380470, B

15-61

1, 4-8
2-3, 9-6 1

1, 4-8
2-3, 9-61

1, 4-8
2-3, 9-61

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

理由は特別ページ参照のこと。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61に共通の事項は請求の範囲1に記載されたとおりの糖ヌクレオチドの製造法である。

しかしながら、調査の結果、この糖ヌクレオチドの製造法は文献1 [JP, 47-1837, B (緒方浩一) 19. 1 1972 (19. 01. 72)], 文献2 [JP, 46-40756, B (緒方浩一) 1. 12月. 1971 (01 12. 71)], 文献3 [JP, 62-134096, A (雪印乳業株式会社) 17. 6月. 1987 (17. 06. 87)]に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

(請求の範囲1における酵素源、すなわち微生物の培養液の処理物とは請求の範囲4に記載されている通り、培養液を遠心分離して得られる細胞及びその細胞の機械的壓搾処理物より抽出して得られる酵素標品を含むものである。文献1~2における酵素源、及び文献3における微生物としては、菌体それ自体あるいは菌体を含む培養物をそのまま用いると共に、菌体磨砕物、菌体抽出物などを使用してもよいことが記載されているから、請求の範囲1における酵素源は、文献1~2における酵素源、及び文献3における微生物にそれぞれ該当する。よって、両者に相違はない。)

結果として請求の範囲1に記載されたとおりの糖ヌクレオチドの製造法は先行技術の域を出ないから、PCT規則13. 2の第2文の意味において、この共通事項 (請求の範囲1の発明) は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61に共通の事項はない。PCT規則13. 2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の特徴は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な連関を見いだすことはできない。結局、請求の範囲1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61は発明の単一性の要件を満たしていないことが明かである。

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 1011		国際出願番号 PCT/J P 97/03226		出願人(氏名又は名称) 協和発酵工業株式会社	
今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		優先日 (日.月.年) 17.09.96	国際出願日 (日.月.年) 12.09.97		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

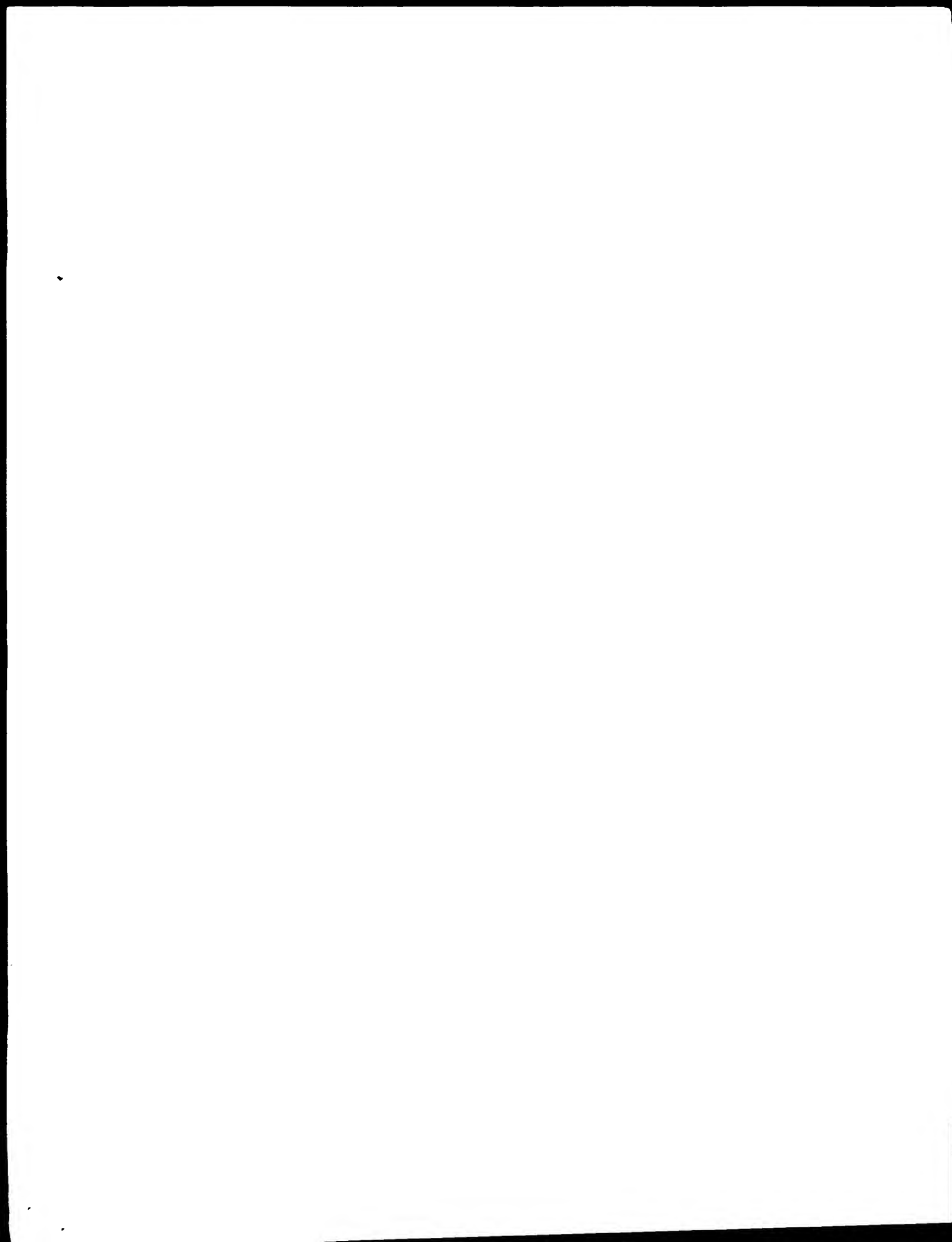
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1か月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

第8条第3項 (PCT 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成できなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

理由は特別ページ参照のこと。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/03226

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P19/26, C12N1/21, C12N5/54, C12N5/16//
(C12P19/26, C12R1:19, C12R1:15)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P19/26, C12N1/21, C12N5/54, C12N5/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
----------------	-----------------------------------	------------------

X

J P, 47-1837, B1 (緒方浩一)
19. 1月. 1972 (19. 01. 72)

X

J P, 46-40756, B1 (緒方浩一)
1. 12月. 1971 (01. 12. 71)

X

J P, 62-134096, A (雪印乳業株式会社)
17. 6月. 1987 (17. 06. 87)

1, 4-8
2-3, 9-61

1, 4-8
2-3, 9-61

1, 4-8
2-3, 9-61

☒

C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行

「O」口頭による開示、使用、展示等による文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

国際調査を完了した日

11. 12. 97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 倫子



4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3449



C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 47-46351, B1 (丸金醤油株式会社)	1, 4-8
Y	22. 11月. 1972 (22. 11. 72) (フミリーなし)	2-3, 9-61
X	JP, 57-18893, A (旭化成工業株式会社)	1, 4-8
Y	30. 1月. 1982 (30. 01. 82) (フミリーなし)	2-3, 9-61
X	JP, 7-233187, A (扶桑薬品工業株式会社)	1, 4-8
Y	5. 9月. 1995 (05. 09. 95) (フミリーなし)	2-3, 9-61
Y	JP, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.) &WO, 87/05937, A &EP, 380470, B	15-61



請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61に共通の事項は請求の範囲1に記載されたとおりの糖スクレオチドの製造法である。

しかしながら、調査の結果、この糖スクレオチドの製造法は文献1 [JP, 47-1837, B (緒方浩一) 19. 1月. 1972 (19. 01. 72)], 文献2 [JP, 46-40756, B (緒方浩一) 1. 12月. 1971 (01. 12. 71)], 文献3 [JP, 62-134096, A (雪印乳業株式会社) 17. 6月. 1987 (17. 06. 87)] に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

(請求の範囲1における酵素源、すなわち微生物の培養液の処理物とは請求の範囲4に記載されている通り、培養液を遠心分離して得られる細胞の機械的磨砕処理物より抽出して得られる酵素標品を含むものである。文献1～2における酵素源、及び文献3における微生物としては、菌体それ自体あるいは菌体を含む培養物をそのまま用いると共に、菌体磨砕物、菌体抽出物などを使用してもよいことが記載されているから、請求の範囲1における酵素源は、文献1～2における酵素源、及び文献3における微生物にそれぞれ該当する。よって、両者に相違はない。)

結果として請求の範囲1に記載されたとおりの糖スクレオチドの製造法は先行技術の域を出ないから、PCT規則13. 2の第2文の意味において、この共通事項 (請求の範囲1の発明) は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61に共通の事項はない。PCT規則13. 2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の特徴は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な連関を見いだすことはできない。結局、請求の範囲1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61は発明の単一性の要件を満たしていないことが明かである。



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS
(PCT Administrative Instructions, Section 4.1)

To:
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100
JAPON

Date of mailing (day/month/year)	03 November 1997 (03.11.97)
Applicant's or agent's file reference	1011

International application No.	PCT/J97/03226
International filing date (day/month/year)	12 September 1997 (12.09.97)
Priority date (day/month/year)	17 September 1996 (17.09.96)

Applicant	KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al
-----------	-----------------------------------

The applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to the following application(s):

Priority application No.	8/244451	8/285066
Priority date:	17 Sep 1996 (17.09.96)	28 Oct 1996 (28.10.96)
Priority country:	JP	JP
Date of receipt of priority document:	31 Oct 1997 (31.10.97)	31 Oct 1997 (31.10.97)

RECEIVED
NOV 11 1997
I.P. DEPT

WPRJD

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---





2293 - V. B. SW. K. D.
070 340 2043
070 340 2043
070 340 2043
FAX 070 340 2043

Europäisches
Patentamt
Zweigstelle in
Den Haag
Rechtsbereich
Anmeldung

European
Patent Office
Branch at
The Hague
Section
Division

Office européen
des brevets
Division de la
Recherche
Technique

VOSSIUS & PARTNER
Postfach 86 07 67
81634 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN
VOSSIUS & PARTNER
18. Dez. 2000
E-51
C 1766 EP

Datum/Date
15.12.2000

Anmeldung Nr./Application No./Demande n° // Patent Nr./Patent No./Brevet n°	97940365.6-2110/JP9703226
Zeichen/Ref./Ref	C 1766 EP
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentier/Proprietor/Titulaire	KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits the partial European search report under Rule 46(1) EPC relating to the above-mentioned European patent application.

Copies of the documents cited in the search report are enclosed.

The applicant's attention is drawn to the following:

The search Division informs the applicant that if the European search report is also to cover inventions other than the invention first mentioned in the claims, a further search fee must be paid for each of these inventions, within ONE MONTH after notification of this communication.

If the application has been filed up to 30 June 1999, the search fee in force before 01 July 1999 (EUR 869.--) or the equivalent applicable on the date of payment is payable.

This applies also to the search fees requested under Rule 46(1) EPC.

See also OJ EPO 06/1999, 405.

☐ The abstract was modified by the Search Division and the definitive text is attached to the present communication.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

Note to users of the automatic debiting procedure:



Unless the EPO receives prior instructions to the contrary, the search fee(s) will be debited on the last day of the period for payment. For further details see the Arrangements for the automatic debiting procedure, Supplement to OJ EPO 02/1999.

REG STERED LETTER

EPO Form 1317/2 07/99





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Incl. 6)
X	DATABASE WPI Week 199033 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-252055 XP002152036 & JP 02 177891 A (SNOW BRAND MILK), 10 July 1990 (1990-07-10) * abstract *	I-33	C12P19/26 C12N1/21 C12N15/54 C12N5/16 C12P19/30 C12P19/18 C12P19/26, //(C12P19/26, C12R1:19, I:15)
X	K. DRAUTZ, H. WALDMANN: ENZYME CATALYSIS IN ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 1, 1995, pages 279-317, XP002152035 Weinheim * the whole document *	I-33	
E	EP 0 861 902 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 2 September 1998 (1998-09-02) * the whole document *	I-33	
A	EP 0 553 821 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 4 August 1993 (1993-08-04)		
LACK OF UNITY OF INVENTION The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely: see sheet B The present partial European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the invention first mentioned in the claims			
MUNICH Place of search 15 November 2000 Date of completion of the search Bardilli, W Examiner		CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X particularly relevant if taken alone Y particularly relevant if combined with another document of the same category A technological background O non-written disclosure P intermediate document T theory or principle underlying the invention E earlier patent document, but published on, or after the filing date D document cited in the application L document cited for other reasons G member of the same patent family, corresponding document	



PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT

European Patent
Office



<p>CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IntCl.6)</p>		<p>DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>	
<p>Category</p>	<p>X</p>	<p>Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages</p>	<p>Relevant to claim</p>
<p>THIEM, J. AND STANGIER, P.: "Preparative-enzymatic formation of cytidine-5'-monophosphate by integrated cytidine-5'-triphosphate regeneration" LIEBIGS ANN. CHEM., vol. 11, 1990, pages 1101-5, XP000941462 scheme 1</p>		<p>1-33</p>	
<p>TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IntCl.6)</p>		<p>1-33</p>	



ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.

EP 97 94 0365

15-11-2000

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

JP 2177891	A	10-07-1990	JP	5073391	B	14-10-1993
------------	---	------------	----	---------	---	------------

EP 0861902	A	02-09-1998	AU	4220297	A	02-04-1998
			CA	2237586	A	19-03-1998
			CN	1208440	A	17-02-1999
			WO	9811247	A	19-03-1998

EP 0553821	A	04-08-1993	AT	150487	T	15-04-1997
			CN	1074938	A	04-08-1993
			DE	69308908	D	24-04-1997
			ES	2100376	T	16-06-1997
			HK	1000604	A	09-04-1998
			JP	5276974	A	26-10-1993
			KR	177841	B	01-04-1999





European Patent
Office

LACK OF UNITY OF INVENTION
SHEET B

Application Number
EP 97 94 0365

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims: 1-33

Methods for the preparation of sugar nucleotides and their
use to prepare complex carbohydrates

2. Claims: 34,35

method for the preparation of N-acetylglucosamine-1-phosphate

The common concept of both inventions as defined in their independent claims resides in the use of a sugar to prepare phosphate containing sugar derivatives using enzymes or microorganisms capable of producing such enzymes. Such a concept is comprised in the prior art (cf. ENZYME CATALYSIS IN ORGANIC SYNTHESIS, chapter B 1.3.2, pages 286-288, in particular page 287: 'GDP-mannose has been prepared from Glc and GMP using dried Baker's yeast cells'; furthermore: JP-A-2 177 891). Therefore, the inventions are not linked with each other to form a single general inventive concept.





CLAIMS INCURRING FEES

The present European patent application comprised at the time of filing more than ten claims.

☐ Only part of the claims have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims and for those claims for which claims fees have been paid, namely claim(s):

☐ No claims fees have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims.

LACK OF UNITY OF INVENTION

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

see sheet B

☒ All further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for all claims.

☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the Search Division did not invite payment of any additional fee.

☐ Only part of the further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the inventions in respect of which search fees have been paid, namely claims:

☐ None of the further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the invention first mentioned in the claims, namely claims:





The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims: 1-33

Methods for the preparation of sugar nucleotides and their use to prepare complex carbohydrates

2. Claims: 34,35

method for the preparation of N-acetylglucosamine-1-phosphate





Application under Article 15(2) Rules relating to fees, a separate communication from the Pleading Section on the refund of the search fee will be sent along.

REFUND OF THE SEARCH FEE

☒ Additional copy(ies) of the documents cited in the European search report.

Figure:

The invention than the one indicated by the applicant.

☐ The following figure will be published with the abstract, since the Search Division considers that it better characterises

☐ The abstract was modified by the Search Division and the definitive text is attached to this communication.

☐ Abstract

☐ Title

☐ Figure

The following specifications given by the applicant have been approved by the Search Division :

enclosed:

relating to the above-mentioned European patent application. Copies of the documents cited in the search report are

☒ the supplementary European search report concerning the international application under Article 15(2) EPC

☐ the partial European search report under Rule 45 EPC

☐ the declaration under Rule 45 EPC

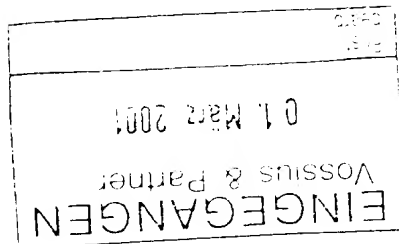
☐ the European search report

The European Patent Office herewith transmits

COMMUNICATION

Anmelder/Applicant/Demandeur/Propriétaire/Titulaire KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.	
Zeichen/Ref./Ref. C 1766 EP	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent No./Brevet n° 97940365.6

Datum/Date 27.02.2001



VOSSIUS & PARTNER
Postfach 86 07 67
81634 München
ALLEMAGNE

RECEIVED
APR 11 2001
EPO CENTER 1600 2800
27.02.2001

2260 HV Rijswijk (ZH)
TX 3151 EPO NL
FAX +31 70 340 3016

Patentamt
Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
Abteilung

Patent Office
Recherche
in Den Haag
Division

des brevets
Département a
La Haye
Division de la
recherche





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X	DATABASE WPI Week 199033 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-252055 XP002152036 & JP 02 177891 A (SNOW BRAND MILK), 10 July 1990 (1990-07-10) * abstract *	1-33	C12P19/26 C12N1/21 C12N15/54 C12N5/16 C12P19/30 C12P19/18 C12P19/26, //(C12P19/26, C12R1:19,1:15)
X	K. DRAUTZ, H. WALDMANN: ENZYME CATALYSIS IN ORGANIC SYNTHESIS, vol. 1, 1995, pages 279-317, XP002152035 Weinheim * the whole document *	1-33	
E	EP 0 861 902 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 2 September 1998 (1998-09-02) * the whole document *	1-33	
A	EP 0 553 821 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 4 August 1993 (1993-08-04)		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
X	THIEM, J. AND STANGIER, P.: "Preparative-enzymatic formation of cytidine-5'-monophosphate by integrated cytidine-5'-triphosphate regeneration" LIEBIGS ANN. CHEM., vol. 11, 1990, pages 1101-5, XP000941462 scheme 1	1-33	C12P
A	PATTABIRAMAN, T.N. AND BACHHAWAT, B.K.: "Interconversion of N-acetyl glucosamine 6-phosphate & N-acetyl glucosamine 1-phosphate in rat brain" J. SCI. IND. RES., vol. 21C, 1962, pages 352-4, XP000974160 * the whole document *	34,35	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. --- -/-			
Place of search		Date of completion of the search	
MUNICH		13 February 2001	
Examiner		Bardili, W	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X partially relevant (taken alone) Y partially relevant if combined with another document of the same category A technical background document D non-written disclosure P intermediate document E earlier patent document, but published on or after the filing date of the application L document cited for other reasons G member of the same patent family / corresponding document I theory or principle underlying the invention			



SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

European Patent
Office



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
----------	---	-------------------	--

A	HEIDLAS, J.E. ET AL: "Gram-scale synthesis of uridine 6-diphospho-N-acetylglucosamine" J. ORG. CHEM., vol. 57, 1992, pages 146-51, XP000973983 * the whole document *	34, 35	
A	RAO, A.K. AND MENDICINO, J.: "Synthesis of UDP-N-(1-14C)acetyl D-glucosamine and UDP-N-(1-14C)acetyl D-galactosamine from ANAL. BIOCHEM., vol. 91, 1978, pages 490-5, XP000974021 * the whole document *	34, 35	

TECHNICAL FIELDS
SEARCHED (Int.Cl.6)

The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.	
--	--

DATE OF SEARCH	13 February 2001	Banditi, W
----------------	------------------	------------

CATEGORY OF CITED DOCUMENTS

- X particularly relevant taken as prior art
- Y particularly relevant if combined with another document of the same category
- Z document of the same category
- A technical background
- B non-technical background
- C non-patent literature
- D non-patent literature
- E member of the same patent family, corresponding to document
- F document

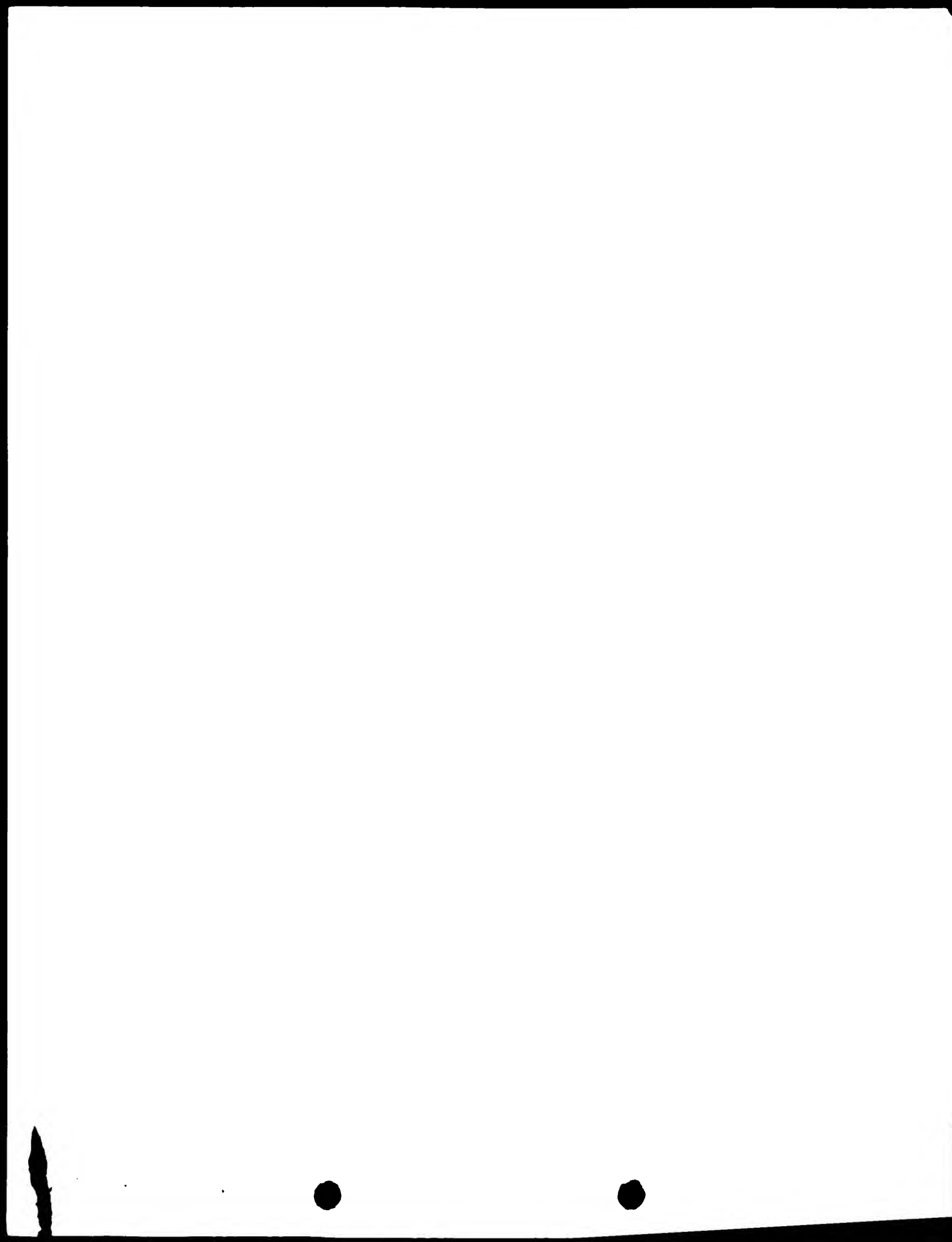


ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO. EP 97 94 0365

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on the European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

13-02-2001

Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Patent document cited in search report
14-10-1993	JP 5073391 B	10-07-1990	JP 2177891 A
02-04-1998	AU 4220297 A	02-09-1998	EP 0861902 A
19-03-1998	CA 2237586 A		
17-02-1999	CN 1208440 A		
19-03-1998	WO 9811247 A		
15-04-1997	AT 150487 T	04-08-1993	EP 0553821 A
04-08-1993	CN 1074938 A		
24-04-1997	DE 69308908 D		
16-06-1997	ES 2100376 T		
09-04-1998	HK 1000604 A		
26-10-1993	JP 5276974 A		
01-04-1999	KR 177841 B		



International application No.

PCT/JP97/03226

PCT/JP97/03226



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

extracting these cells after being mechanically disrupted, as described in Claim 4. It is stated in the references that the enzyme sources usable in References 1 and 2 and the microorganisms usable in Reference 3 involve not only the cells per se and cultures containing the cells, but also disrupted cells, cell extracts, etc. Thus, the enzyme source as described in Claim 1 corresponds to the enzyme sources in References 1 and 2 and the microorganisms in Reference 3. Accordingly, there is no difference among them.)

Consequently, the process for producing sugar nucleotides as claimed in Claim 1 does not lie outside the category of the prior art and, therefore, the common matter (the invention of Claim 1) is not a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT.

Therefore, there is no common matter in Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61. Since there is no common feature regarded as a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT, these inventions differing from each other are not technically linked to each other under the provisions of Rule 13 of the Regulations under the PCT. Such being the case, the inventions of Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61 do not comply with the requirement of unity of invention.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP97/03226	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16 // (C12P19/26, C12N1:19, C12N1:15) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documents searched (classification symbols followed by classification symbols) Int. Cl. ⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16 Documents searched other than minimum documents to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	JP, 47-1837, B1 (Kotchi Ogata), January 19, 1972 (19. 01. 72) (Family: none)
X	JP, 46-40756, B1 (Kotchi Ogata), December 1, 1971 (01. 12. 71) (Family: none)
X	JP, 62-134096, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), June 17, 1987 (17. 06. 87) (Family: none)
X	JP, 47-46351, B1 (Marukin Shoyu Co., Ltd.), November 22, 1972 (22. 11. 72) (Family: none)
X	JP, 57-18893, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), January 30, 1982 (30. 01. 82) (Family: none)
X	JP, 7-233187, A (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), September 5, 1995 (05. 09. 95) (Family: none)
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
	1, 4-8 2-3, 9-61
Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
5 special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published as or after the international filing date "L" document which may have priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account "Z" document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the prior art or theory underlying the invention	
Date of the actual completion of the international search December 11, 1997 (11. 12. 97) Date of mailing of the international search report January 13, 1998 (13. 01. 98)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. Telephone No. Authorized officer	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

15 - 61

JP, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.),
March 1, 1989 (01. 03. 89)

WO, 87/05937, A & NO, 179875, B
EP, 380470, B

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

09/068528

国際調査報告 PCT/J-P97/03226

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		Int. Cl. C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16// (C12P19/26, C12R1:19, C12R1:15)	
B. 調査を行った分野		調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)			
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号	関連する
X	J.P. 47-1837, B1 (特方特一)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	J.P. 46-40756, B1 (特方特一)	1, 4-8	2-3, 9-61
X	J.P. 62-134096, A (雷印乳業株式会社)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	17. 6月. 1987 (17. 06. 87)		
	(フミリーなし)		
Y	J.P. 47-1837, B1 (特方特一)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	19. 1月. 1972 (19. 01. 72)		
	(フミリーなし)		
Y	J.P. 46-40756, B1 (特方特一)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	1. 12月. 1971 (01. 12. 71)		
	(フミリーなし)		
X	J.P. 62-134096, A (雷印乳業株式会社)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	17. 6月. 1987 (17. 06. 87)		
	(フミリーなし)		
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の欄にも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パラグラフファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリ 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に抵触する文献又は他の文献の先行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日		11. 12. 97	
国際調査機関の名称及び先		日本国特許庁 (ISA/J-P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	
特許庁審査官 (増設のある職員)		田中 倫子	
4B 9453		電話番号 03-3581-1101 内線 3449	
国際調査報告の発注日		13.01.98	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

C (続き)		関連すると認められる文獻	
引用文獻の カテゴリー*	引用文獻名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号	関連する
X	J.P. 47-46351, B1 (丸金巻機株式会社)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	22. 11月. 1972 (22. 11. 72)		
	(フミリ-なし)		
X	J.P. 57-18893, A (組化成工業株式会社)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	30. 1月. 1982 (30. 01. 82)		
	(フミリ-なし)		
X	J.P. 7-233187, A (扶桑薬品工業株式会社)	1, 4-8	2-3, 9-61
Y	5. 9月. 1995 (05. 09. 95)		
	(フミリ-なし)		
Y	J.P. 1-500560, A (Corty Sci. Dev. Co.)	15-61	
	1. 3月. 1989 (01. 03. 89)		
	&WO. 87/05937, A		
	&EP. 380470, B		
	&NO. 179875, B		



国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/03226

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(b))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

理由は特別ページ参照のこと。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみが期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の員額の手立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から員額申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から員額申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (特別ページ) (1992年7月)



*"REQUEST FOR RECTIFICATION
OF OBVIOUS ERROR"
FILED AT INTERNATIONAL STAGE
AND
ENGLISH TRANSLATION THEREOF*

09/068528



明らかな誤りの訂正請求書

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 97/03226

2. 出 願 人

名 称 協和醗酵工業株式会社
あて名 Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
〒100 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 100 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

3. 訂正の対象

明細書 第1、5、7及び82頁

4. 訂正の内容

別紙のとおり
明細書 第1、5、82頁の「ヌクレオチド-5'」を
「ヌクレオシド-5'」と訂正する。
明細書 第7頁の「ヌクレイオシド5'」を「ヌクレオ
シド-5'」と、「シチジン5'」を「シチジン-5'」
と訂正する。

5. 添付書類の目録

明細書第1頁の新たな用紙 1通
明細書第5頁の新たな用紙 1通
明細書第7頁の新たな用紙 1通
明細書第82頁の新たな用紙 1通

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

技術分野

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療

等に有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖

ヌクレオチドの製造方法に関する。

背景技術

糖ヌクレオチドの製造方法として、1) 化学合成法 [Adv. Carbohydr. Chem.

Biochem., 28, 307 (1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275 (1973)、J.

Org. Chem., 57, 146 (1992)、Carbohydr. Res., 242, 69 (1993)]、2) 酵素

を用いた製造方法 [J. Org. Chem., 55, 1834 (1990)、J. Org. Chem., 57, 152

(1992)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)、特表平 7-508413、特表平 7-

500248、W096/27670]、3) 酵母等の微生物菌体を用いる方法 (特公昭 45-2073、

特公昭 46-40756、特公昭 47-1837、特公昭 47-26703、特公昭 49-8278、特開平

2-268692) 4) 耐塩性酵母の微生物菌体からの抽出法 (特開平 8-23993) 等が知

られている。

1) の方法においては、高価なヌクレオシド-5'-一リン酸 (以下、NMP

と略す) のモルフォリチート誘導体や糖リン酸等が必要であり、2) の方法にお

いては、ヌクレオシド-5'-二リン酸 (以下、NDPと略す)、ヌクレオシド

-5'-三リン酸 (以下、NTPと略す)、ホスホエノールピルビン酸、糖リン

酸等の高価な原料やピルビン酸キナーゼ等多数の酵素が必要であり、3) の方法

においては菌体の乾燥処理等が必要である。4) の方法を含め、上記いずれの方

法においても、原料として高価なヌクレオチドや糖リン酸等が用いられていたり、

操作的に大量生産が困難であるため、今日に至るまで、糖ヌクレオチドの工業的

規模での製造法は確立されていない。

第1-(1)表および第1-(2)表に本発明に用いる略号および該略号の説明を記す。

第1-(1)表

Glc	グルコース
G-6-P	グルコース-6-リン酸
G-1-P	グルコース-1-リン酸
Glc-1, 6-P ₂	グルコース-1, 6-二リン酸
Ga1	ガラクトース
Ga1-1-P	ガラクトース-1-リン酸
GlcN-6-P	グルコサミン-6-リン酸
GlcN-1-P	グルコサミン-1-リン酸
GlcUA	グルクロン酸
GlcN	グルコサミン
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン
GlcNAc-1-P	N-アセチルグルコサミン-1-リン酸
F-6-P	フルクトース-6-リン酸
F-1, 6-P ₂	フルクトース-1, 6-二リン酸
Man	マンノース
Man-6-P	マンノース-6-リン酸
Man-1-P	マンノース-1-リン酸
GDP-4-keto-6-deoxyMan	6-デオキシマンノース
ManNAc	N-アセチルマンノース
NeuAc	N-アセチルノイラムニン酸
NeuAcCoA	アセチルコエノサイルA
NTP	ヌクレオシド-5' -三リン酸
NDP	ヌクレオシド-5' -二リン酸
NMP	ヌクレオシド-5' -一リン酸
ATP	アデノシド-5' -三リン酸
UTP	ウリジド-5' -三リン酸
GTP	グアノシド-5' -三リン酸
CTP	シチジン-5' -三リン酸
GMP	グアノシド-5' -一リン酸

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

本発明によれば、1) NTPや糖リッ酸等の高価な原料を必要とせず、オロツト酸等の安価なヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料とする、2) NMPあるいはNDPからNTPへの転換において高価なホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼの添加を必要としない、さらに、3) 酵素の単離操作を必要としない等の特徴を有する糖ヌクレオチドの新規な製造法および酸糖ヌクレオチド製造法を利用した新規な複合糖質の製造法を提供できる。

本発明の製造法で製造される糖ヌクレオチドとしては、ヌクレオシド-5'-二リン酸残基の末端リン酸基と糖残基の還元基とがエステル結合をした一般構造を有する化合物をあげることができ、更に、ヌクレチド残基がシチジン-5'-一リン酸のもの、糖残基がポリオールのもとも本発明により製造される糖ヌクレオチドに含まれる。

本発明の製造法で製造される複合糖質としては、単糖、オリゴサッカライド、担体等に結合した単糖またはオリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、糖脂質、グリコペプチドあるいはヌクレオイド化合物等に糖質が結合した化合物をあげることができ。

以下に本発明を詳細に説明する。

1) 本発明で用いられるヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物としては、ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物であればいずれも用いることができ、例えば、エシエリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物等をあげることができる。

2) 本発明で用いられる糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物としては、目的とする糖ヌクレオチドを生成する活性を有する生物であればいずれでも用いることができ、例えば、



請求の範囲

1. a) ヌクレオチドの前駆物質からヌクレオシド-5'-三リン酸(以下、NTPと略す)を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb) 糖とNTPからヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中からヌクレオチドを採取することを特徴とするヌクレオチドの製造法。

2. a) ヌクレオチドの前駆物質からヌクレオシド-5'-三リン酸(以下、NTPと略す)を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb) 糖とNTPからヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆物質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、およびc) 糖とヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前の複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

3. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質前駆物質および請求項1記載の製造法により得られた糖ヌクレオチドを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

4. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

REQUEST FOR RECTIFICATION
OF OBVIOUS ERROR

To: Commissioner of the Patent Office

1. Identification of the International Application

PCT/JP97/02283

2. Applicant

Name: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
Address: 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100
Japan
Country of nationality: Japan
Country of residence: Japan

3. Item to be Rectified

Specification pages 1, 5, 7 and 82

4. Subject of Matter of Rectification

As per the attached sheets
Pages 1, 5 and 82 in the specification, " nucleoside-5' "
is corrected to " nucleoside-5' ".
Page 7 in the specification, " nucleoside 5' " and
" cytidine 5' " are corrected to " nucleoside-5' " and
" cytidine-5' ", respectively.

5. List of Attached Documents

New page 1 correctly typed on the specification 1 copy
New page 5 correctly typed on the specification 1 copy
New page 7 correctly typed on the specification 1 copy
New page 82 correctly typed on the specification 1 copy



PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES

TECHNICAL FIELD

This invention relates to a process for producing a complex carbohydrate which is useful for protection against infection of bacteria, viruses and the like, application to cardiovascular disorders and immunotherapy and to a process for producing a sugar nucleotide which is important as a substrate for the synthesis of the complex carbohydrate.

BACKGROUND ART

Examples of the known process for producing sugar nucleotides include: 1) chemical synthetic processes (Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307 (1973), Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275 (1973), J. Org. Chem., 57, 146 (1992), Carbohydr. Res., 242, 69 (1993)); 2) production processes using enzymes (J. Org. Chem., 55, 1834 (1990), J. Org. Chem., 57, 152 (1992), J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988), Japanese Published Unexamined National Publication No. 508413/95, Japanese Published National Publication No. 500248/95, WO 96/27670); 3) processes using microbial cells such as yeast and the like (Japanese Published Examined Patent Application No. 2073/70, Japanese Published Examined Patent Application No. 40756/71, Japanese Published Examined Patent Application No. 1837/72, Japanese Published Examined Patent Application No. 26703/72, Japanese Published Examined Patent Application No. 8278/74, Japanese Published Examined Patent Application No. 268692/90); and 4) an extraction process from microbial cells of halo-tolerant yeast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 23993/96). However, the process 1) requires expensive materials (for example, morpholide derivative of nucleoside-5'-monophosphate (referred to as "NMP" hereinafter), sugar phosphate, etc.); the process 2) requires expensive materials (for example, nucleoside-5'-diphosphate (referred to as "NDP" hereinafter), nucleoside-5'-triphosphate (referred to as "NTP" hereinafter),

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

phosphoenolpyruvate, etc.), and various enzymes (e.g., pyruvate kinase, etc.); and the process 3) requires drying treatment of microbial cells. Including the process 4), all of the above-mentioned processes use expensive nucleotides, sugar phosphates, and the like or have a difficulty in effecting large scale production from the operational point of view, so that an industrial scale production process of sugar nucleotides has not so far been established.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

Abbreviations to be used herein and description of the abbreviations are shown in Table 1-(1) and Table 1-(2).

Table 1-(1)

glc	glucose
G-6-P	glucose-6-phosphate
G-1-P	glucose-1-phosphate
glc-1,6-P ₂	glucose-1,6-diphosphate
gal	galactose
gal-1-P	galactose-1-phosphate
glcn-6-P	glucosamine-6-phosphate
glcn-1-P	glucosamine-1-phosphate
glcn	glucosamine
glcnac	N-acetylglucosamine
glcnac-1-P	N-acetylglucosamine-1-phosphate
F-6-P	fructose-6-phosphate
F-1,6-P ₂	fructose-1,6-diphosphate
man	mannose
Man-6-P	mannose-6-phosphate
Man-1-P	mannose-1-phosphate
GDP-4-keto-6-deoxyMan	guanosine-5'-diphosphate-4-keto-6-deoxymannose
ManNAc	N-acetylmannosamine
ManNAc	N-acetylneuraminic acid
acetyl CoA	acetyl coenzyme A
NDP	nucleoside-5'-triphosphate
NDP	nucleoside-5'-diphosphate
NMP	nucleoside-5'-monophosphate
ATP	adenosine-5'-triphosphate
UTP	uridine-5'-triphosphate
GTP	guanosine-5'-triphosphate
CTP	cytidine-5'-triphosphate
GMP	guanosine-5'-monophosphate



According to the present invention, a novel production process of a sugar nucleotide and a novel production process of a complex carbohydrate using the sugar nucleotide production process can be provided, which are characterized in that 1) expensive materials (for example, NTP, sugar phosphates, etc.) are not required, and inexpensive nucleotide precursors and a sugar can be used as the sole starting materials, 2) addition of expensive phosphoenolpyruvic acid and pyruvate kinase is not necessary in converting NMP or NDP into NTP, and 3) a process for the isolation of enzymes is not necessary.

With regard to the sugar nucleotide to be produced by the production process of the present invention, compounds having a general structure in which the terminal phosphate group of a nucleoside-5'-diphosphate residue and the reducing group of a sugar residue are linked together by ester bonding can be exemplified, and those compounds in which the nucleotide residue is cytidine-5'-monophosphate and the sugar residue is a polyol are also included in the sugar nucleotide to be produced by the present invention.

Examples of the complex carbohydrate to be produced by the production process of the present invention include compounds in which carbohydrates are bound to monosaccharides, oligosaccharides, monosaccharides or oligosaccharides linked to a carrier or the like, proteins, peptides, lipids, glycoproteins, glycolipids, glycopeptides, steroid compounds or the like.

The present invention will be described in detail below.

1) With regard to the microorganism for use in the present invention capable of producing NTP from a nucleotide precursor, examples include microorganisms belonging to the genus *Escherichia* and the like. The microorganisms belonging to the genus *Escherichia* include *Escherichia coli* and the like.

The microorganisms belonging to the genus *Corynebacterium* include *Corynebacterium ammoniagenes* and the like.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

2) As the microorganism for use in the present invention capable of producing a sugar nucleotide from a sugar and ATP, any microorganism having the activity to form the sugar nucleotide of interest can be used as follows.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

microorganisms, an animal cell or an insect cell capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a selecting, as an enzyme source, a culture broth of a comprises:

3. A process for producing a complex carbohydrate, which medium.

recovering the complex carbohydrate from the aqueous in the aqueous medium; and aqueous medium to form and accumulate the complex carbohydrate sugar and the complex carbohydrate precursor to be present in an allowing the enzyme sources, the nucleotide precursor, the product of the culture broth;

nucleotide and a complex carbohydrate precursor, or a treated cell capable of producing a complex carbohydrate from a sugar a culture broth of a microorganism, an animal cell or an insect sugar and ATP, or a treated product of the culture broth, and c) a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from a or a treated product of the culture broth, b) a culture broth of (referred to as "ATP" hereinafter) from a nucleotide precursor, microorganism capable of producing nucleoside-5'-triphosphate selecting, as enzyme sources, a) a culture broth of a comprises:

2. A process for producing a complex carbohydrate, which recovering the sugar nucleotide from the aqueous medium.

the sugar nucleotide in the aqueous medium; and the sugar to be present in an aqueous medium to form and accumulate allowing the enzyme sources, the nucleotide precursor and a sugar and ATP, or a treated product of the culture broth;

of a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from or a treated product of the culture broth, and b) a culture broth (referred to as "ATP" hereinafter) from a nucleotide precursor, microorganism capable of producing nucleoside-5'-triphosphate selecting, as enzyme sources, a) a culture broth of a comprises:

1. A process for producing a sugar nucleotide, which

WHAT IS CLAIMED IS:

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.

The fourth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The fifth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The sixth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.

The seventh part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The eighth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The ninth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.

The tenth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The eleventh part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The twelfth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.

complex carbohydrate precursor, or a treated product of the culture broth; allowing the enzyme source, the complex carbohydrate precursor and the sugar nucleotide prepared by the process of claim 1 to be present in an aqueous medium to form and accumulate the complex carbohydrate in the aqueous medium; and recovering the complex carbohydrate from the aqueous medium.

4. The process according to any one of claims 1, 2 and 3, wherein the treated product of culture broth is a concentrated product of the culture broth, a dried product of the culture broth, a culture supernatant obtained by centrifuging the culture broth, a concentrated product of the culture supernatant, an enzyme preparation obtained from the culture supernatant, cells obtained by centrifuging the culture broth, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells,

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

63. The process according to claim 62, wherein the microorganism is a microorganism having a recombinant DNA comprising a vector and a DNA fragment which contains a gene encoding a transferase selected from glucosyltransferase, galactosyltransferase, N-acetylglucosaminyltransferase, N-acetylglactosaminyltransferase, glucuronosyltransferase, mannosyltransferase, sialyltransferase and fucosyltransferase.
64. The process according to claim 63, wherein the gene encoding a transferase selected from glucosyltransferase, galactosyltransferase, N-acetylglucosaminyltransferase, N-acetylglactosaminyltransferase, glucuronosyltransferase, mannosyltransferase, sialyltransferase and fucosyltransferase is derived from a microorganism.
65. The process according to claim 2 or 3, wherein the animal cell is COS-7 cell or mammary KM-1 cell, and the insect cell is Sf9 cell.
66. The process according to claim 2 or 3, wherein the animal cell or insect cell is an animal cell or insect cell having a recombinant DNA comprising a vector and a DNA fragment which contains a gene encoding a transferase selected from glucosyltransferase, galactosyltransferase, N-acetylglucosaminyltransferase, N-acetylglactosaminyltransferase, glucuronosyltransferase, mannosyltransferase, sialyltransferase and fucosyltransferase.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

67. The process according to claim 66, wherein the gene encoding a transferase selected from galactosyltransferase, N-acetylgalactosaminyltransferase, glucuronosyltransferase, N-acetylgalactosaminyltransferase, sialyltransferase and fucosyltransferase is derived from an animal cell.

68. A process for producing N-acetylgalactosamine 1-phosphate, which comprises:

selecting, as an enzyme source, a culture broth of the microorganism of claim 26 having strong galK activity, or a treated product of the culture broth;

allowing the enzyme source and N-acetylgalactosamine to be present in an aqueous medium to form and accumulate N-acetylgalactosamine-1-phosphate in the aqueous medium, and recovering the N-acetylgalactosamine-1-phosphate from the aqueous medium.

69. The process according to claim 68, wherein the microorganism is a microorganism having a recombinant DNA comprising a vector and a DNA fragment which contains a galK-encoding gene.

70. The process according to claim 69, wherein the galK-encoding gene is a gene encoding galactokinase derived from *Escherichia coli*.

71. The process according to claim 68, wherein the treated product of the culture broth is a concentrated

53
PPH

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

product of the culture broth, a dried product of the culture broth, a culture supernatant obtained by centrifuging the culture broth, a concentrated product of the culture supernatant, an enzyme preparation obtained from the culture supernatant, cells obtained by centrifuging the culture broth, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an immobilized product of the cells, or an enzyme preparation obtained by extraction from the cells.

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world. It is argued that the study of the history of the world is essential for a full understanding of the world and its people. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States and the world. It is argued that the study of the history of the United States and the world is essential for a full understanding of the United States and the world.

*"NOTIFICATION OF DECISION CONCERNING
REQUEST FOR RECTIFICATION"
AND
ENGLISH TRANSLATION THEREOF*

PTO/PCT 2000
MAY 1998
09/068828

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

50-10
151

RECEIVED
JAN 14 1998
I.P. DEPT

~~POST~~
~~POST~~

PCT

所らかな誤りの訂正請求についての決定の通知書

(送達付規則第77条第3項、第4項)

(PCT規則91.1(f))

特許審判部

発行人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人
昭和園工芸株式会社
〒100
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

出願日 (日.月.年) 13.01.98	出願人又は代理人 の登録番号 1011	国際出願番号 PCT/JP97/03226	出願人 (氏名又は名称) 昭和園工芸株式会社
応答不要	ただし、下段の最後の数字を参照	国際出願日 (日.月.年) 12.09.97	

国際出願又は国際調査機関に提出した書類における、出願人が提出した「所らかな誤りの訂正の請求」について、次のとおり決定したことを通知する。
1. ☒ 出願人が請求した訂正について
請求したとおり認める。
☐ 次の範囲において認める。

2. ☐ 次の理由により出願人が請求した訂正の全部又は一部は認めることができない。

この通知書の予し及び明らかな誤りの訂正請求等は国際事務局に送付した。又、許可した場合にこの通知書の予し及び明らかな誤りの訂正請求の予しは受審官庁に送付した。

* 訂正請求の全部又は一部が拒否された場合に、出願人は国際事務局に対して国際公開の技術的な理解の完了するときに、特に特別の平量料の支払を条件として、訂正のための請求を国際出版とともに公衆することができる。
(PCT規則81.1(f)及び平量料については「PCT出願人の平引き」第1巻・附編第B2 (WO) を参照)

名称及び優先権 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区豊田三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官	電話番号 03-3581-1101 内線 3449
4B	9453	

様式PCT/ISA/217 (1992年7月)

The first part of the paper discusses the importance of the research and the objectives of the study. It then presents a literature review of the existing research on the topic. The second part of the paper describes the methodology used in the study, including the data collection and analysis techniques. The third part of the paper presents the results of the study, and the fourth part discusses the conclusions and implications of the findings.

The study was conducted in a laboratory setting, and the data was collected using a series of experiments. The results of the study show that there is a significant difference between the two groups, and this difference is statistically significant. The findings of the study have important implications for the field of research, and they provide a basis for further research in this area.

In conclusion, the study has shown that there is a significant difference between the two groups, and this difference is statistically significant. The findings of the study have important implications for the field of research, and they provide a basis for further research in this area.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF DECISION CONCERNING
REQUEST FOR RECTIFICATION

(Law Regulation Rule 77.3.4.)
(PCT Rule 91.1(6))

From Japanese Patent Office
(the INTERNATIONAL SEARCH AUTHORITY)

To
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo, 100
Japan

Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.	
International application No. PCT/JP97/03226	Applicant's or agent's file reference 1011
International filing date (day/month/year) 12/09/1997	REPLY DUE NONE However, see last paragraph below
Date of mailing (day/month/year) 13/01/1998	

The applicant is hereby notified that the International Searching Authority has considered the request for rectification of obvious errors in the international application/other papers submitted by the applicant to this Authority, and that it has decided:

1. ☒ to authorize the rectification:
☒ as requested by the applicant.
☐ to the extent set forth below:

2. ☐ to refuse to authorize the rectification or part of it for the following reasons:

A copy of this notification, together with a copy of the applicant's request for rectification, has been sent to the receiving Office and to the International Bureau.

If the authorization of the rectification has been refused in whole or in part, the applicant may request the International Bureau, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, to publish the request for rectification together with the international application. (See Rule 91.1(f), third and fourth sentences, and, for the amount of the fee, see Annex B8(WO), Volume I of the PCT Applicant's Guide.)

Name and mailing address Japanese Patent Office (JSA/JP) 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku Tokyo ZIP 100		Authorized officer Commissioner of Patent Office Tel: 03-3581-1101 ex. 3448
4B	9453	

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

*RECTIFIED PAGES
IN ENGLISH TEXT
ACCORDING TO
"REQUEST FOR RECTIFICATION
OF OBVIOUS ERROR"*

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

No. 1837/72, Japanese Published Examined Patent Application No. 26703/72, Japanese Published Examined Patent Application No. 8278/74, Japanese Published Unexamined Patent Application No. 268692/90; and 4) an extraction process from microbial cells of halo-tolerant yeast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 23993/96).

However, the process 1) requires expensive materials (for example, morpholidate derivative of nucleoside-5'-monophosphate (referred to as "NDP" hereinafter), sugar phosphate, etc.); the process 2) requires expensive materials (for example, nucleoside-5'-diphosphate (referred to as "NDP" hereinafter), nucleoside-5'-triphosphate (referred to as "NDP" hereinafter), phosphoenolpyruvate, etc.), and various enzymes (e.g., pyruvate kinase, etc.); and the process 3) requires drying treatment of microbial cells. Including the process 4), all of the above-mentioned processes use expensive nucleotides, sugar phosphates, and the like or have a difficulty in effecting large scale production from the operational point of view, so that an industrial scale production process of sugar nucleotides has not so far been established.

Examples of the known process for producing complex carbohydrates include 1) chemical synthetic processes (Method in *Enzymol.*, 247, 193 (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21, 155 (1982), *Carbohydr. Res.*, 211, c1 (1991)), 2) processes in

glucose	glucose
G-6-P	glucose-6-phosphate
G-1-P	glucose-1-phosphate
Glc-1,6-P2	glucose-1,6-diphosphate
Gal	galactose
Gal-1-P	galactose-1-phosphate
GlcN-6-P	glucosamine-6-phosphate
GlcN-1-P	glucosamine-1-phosphate
GlcNAc	glucuronic acid
GlcN	glucosamine
GlcNAc-1-P	N-acetylglucosamine-1-phosphate
F-6-P	fructose-6-phosphate
F-1,6-P2	fructose-1,6-diphosphate
Man	mannose
Man-6-P	mannose-6-phosphate
Man-1-P	mannose-1-phosphate
GDP-4-keto-6-deoxyMan	guanosine-5'-diphospho-4-keto-6-deoxymannose
ManNAc	N-acetylmannosamine
NeuAc	N-acetylneuraminic acid
acetyl CoA	acetyl coenzyme A
UTP	uridylic acid-5'-triphosphate
ATP	adenosine-5'-triphosphate
NMP	nucleoside-5'-monophosphate
NDP	nucleoside-5'-diphosphate
NTP	nucleoside-5'-triphosphate
OMP	guanosine-5'-monophosphate

Table 1-(1)

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

According to the present invention, a novel production process of a sugar nucleotide and a novel production process of a complex carbohydrate using the sugar nucleotide production process can be provided, which are characterized in that 1) expensive materials (for example, NTP, sugar phosphates, etc.) are not required, and inexpensive nucleotide precursor and a sugar can be used as the sole starting materials, 2) addition of expensive phosphoenolpyruvic acid and pyruvate kinase is not necessary in converting NDP or NDP into NTP, and 3) a process for the isolation of enzymes is not necessary.

With regard to the sugar nucleotide to be produced by the production process of the present invention, compounds having a general structure in which the terminal phosphate group of a nucleoside-5'-diphosphate residue and the reducing group of a sugar residue are linked together by ester bonding can be exemplified, and those compounds in which the nucleotide residue is cytidine-5'-monophosphate and the sugar residue is a polyol are also included in the sugar nucleotide to be produced by the present invention.

Examples of the complex carbohydrate to be produced by the production process of the present invention include compounds in which carbohydrates are bound to monosaccharides, oligosaccharides, monosaccharides or oligosaccharides linked to a carrier or the like, proteins, peptides, lipids,

animal cell or an insect cell capable of producing a complex culture broth, and c) a culture broth of a microorganism, an nucleotide from a sugar and NTP, or a treated product of the culture broth of a microorganism capable of producing a sugar precursor, or a treated product of the culture broth, b) a (referred to as "NTP" hereinafter) from a nucleotide microorganism capable of producing nucleoside-5'-triphosphate selecting, as enzyme sources, a) a culture broth of a

which comprises:

2. A process for producing a complex carbohydrate,

medium.

recovering the sugar nucleotide from the aqueous

accumulate the sugar nucleotide in the aqueous medium; and and the sugar to be present in an aqueous medium to form and allowing the enzyme sources, the nucleotide precursor

of the culture broth;

sugar nucleotide from a sugar and NTP, or a treated product a culture broth of a microorganism capable of producing a precursor, or a treated product of the culture broth, and b) (referred to as "NTP" hereinafter) from a nucleotide microorganism capable of producing nucleoside-5'-triphosphate selecting, as enzyme sources, a) a culture broth of a

comprises:

1. A process for producing a sugar nucleotide, which

WHAT IS CLAIMED IS:

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

PTO/PCT RECEIVED MAY 1998
09/0528

For receiving Office use only _____	
International Application No. _____	International Filing Date September 12, 1997
Name of receiving Office and "PCT International Application"	

Applicant's or agent's file reference (if desired) (13 characters maximum) 1011

The undersigned requests that the present
international application be processed
according to the Patent Cooperation Treaty.

REQUEST

PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES	
Box No. II APPLICANT Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100 Japan	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Telephone No. 03-3282-0036 Facsimile No. 03-3282-1527 Telex No. 03-3282-1527	
State (i.e. country) of nationality: Japan State (i.e. country) of residence: Japan	
This person is applicant <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> the United States except for the purposes of: <input type="checkbox"/> States <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the Supplemental Box: Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR FURTHER INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Satoshi KOIZUMI 3-9-10, Naka-machi, Machida-shi, Tokyo 194 Japan This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (if the check box is marked, do not fill below) State (i.e. country) of nationality: Japan State (i.e. country) of residence: Japan	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Telephone No. _____ Facsimile No. _____ Telex No. _____	
<input type="checkbox"/> Mark this check-box where no agent or common representative has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Form PCT/RO/101 (first sheet) (January 1997)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entry, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Katsutoshi SASAKI 1171-3-201, Honmachida, Machida-shi, Tokyo 194 Japan		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (if the check-box is marked, do not fill below)
State (i.e. country) of nationality: Japan		State (i.e. country) of residence: Japan
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box:		
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entry, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Tetsuo ENDO 4-17-17, Morino, Machida-shi, Tokyo 194 Japan		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (if the check-box is marked, do not fill below)
State (i.e. country) of nationality: Japan		State (i.e. country) of residence: Japan
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box:		
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entry, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Kazuhiko TABATA 4-17-9, Morino, Machida-shi, Tokyo 194 Japan		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (if the check-box is marked, do not fill below)
State (i.e. country) of nationality: Japan		State (i.e. country) of residence: Japan
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box:		
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entry, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Akio OZAKI 3-9-13, Naka-machi, Machida-shi, Tokyo 194 Japan		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (if the check-box is marked, do not fill below)
State (i.e. country) of nationality: Japan		State (i.e. country) of residence: Japan
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box:		
Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.		

